

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

Molekulargenetische Veränderungen im *WWOX*-Gen bei Harnblasenkarzinomen

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Katharina Kössendrup  
aus  
Berlin  
2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Poetsch

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. F. Grabellus

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 2017

1	EINLEITUNG .....	7
1.1	Inzidenz und Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms.....	7
1.2	Ätiologie und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms .....	7
1.3	Klassifikation des Harnblasenkarzinoms.....	9
1.3.1	Makroskopie: Lokalisation, Morphologie und Metastasierung.....	9
1.3.2	Staging anhand der TNM-Klassifikation.....	9
1.3.3	Histopathologisches Grading.....	10
1.3.4	Histologie.....	11
1.4	Genetik des Harnblasenkarzinoms .....	13
1.4.1	Tumorgenetik.....	13
1.4.2	Techniken in der molekulargenetischen Analyse bei Tumoren .....	14
1.4.3	Tumorgenetik des Harnblasenkarzinoms .....	15
1.4.4	Das <i>WWOX</i> Gen .....	17
1.5	Zielsetzung.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN .....	20
2.1	Untersuchungsgut .....	20
2.2	Immunhistochemie und Antikörper .....	20
2.2.1	Material.....	20
2.2.2	Methode allgemein .....	21
2.2.3	Methode speziell (Dako Protokoll).....	21
2.3	DNA-Extraktion .....	22

2.3.1	Material.....	22
2.3.2	Methode allgemein .....	23
2.3.3	Laborprotokoll .....	23
2.4	DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.4.1	Material.....	24
2.4.2	Methode allgemein .....	25
2.4.3	Methode speziell.....	26
2.5	Gelelektrophorese und Silberfärbung.....	28
2.5.1	Gelelektrophorese.....	28
2.5.2	Silberfärbung .....	30
2.6	Erster Aufreinigungsschritt von PCR-Produkten mit der Clean up Aufreinigung ...	31
2.6.1	Material.....	31
2.6.2	Methode allgemein .....	31
2.6.3	Methode speziell.....	32
2.7	Cycle-Sequenzier-PCR.....	32
2.7.1	Material.....	32
2.7.2	Methode allgemein .....	32
2.7.3	Methode speziell.....	33
2.8	Zweiter Aufreinigungsschritt.....	33
2.8.1	Material.....	33
2.8.2	Methode allgemein .....	33
2.8.3	Methode speziell.....	34
2.9	Kapillargelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten.....	34
2.9.1	Material.....	34
2.9.2	Methode allgemein .....	34

2.9.3	Fragmentanalyse der LOH-Multiplex-PCR.....	35
2.9.4	Auftrennung der Sequenzier-PCR-Produkte .....	35
2.10	Statistik .....	36
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	Klinische Daten .....	37
3.2	Analyse der immunhistochemischen Untersuchungen und Antikörperreaktionen ...	37
3.2.1	Statistische Auswertung der Immunhistochemie .....	39
3.3	Analyse des Heterozygotieverlustes (LOH) .....	40
3.3.1	Ergebnisse der LOH-Analyse für jeden einzelnen Mikrosatellitenlocus .....	40
3.3.2	Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf die einzelnen Mikrosatellitenloci.....	42
3.3.3	Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus .....	42
3.3.4	Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus im Intron 8.....	43
3.4	Mutationsscreening in den Exons des <i>WWOX</i> Gens .....	44
3.5	Analyse der bei den Patienten dieser Studie aufgetretenen Varianten und Vergleich mit publizierten europäischen Daten .....	44
3.5.1	Statistische Auswertung für rs3764340 in Exon 8 .....	46

4 DISKUSSION .....	48
4.1 Methodik.....	48
4.2 Genetische Aberrationen bei Harnblasenkarzinomen .....	50
4.2.1 Expression des <i>WWOX</i> Gens .....	51
4.2.2 Heterozygotieverluste in Mikrosatellitenmarkern in den Introns des <i>WWOX</i> Gens .....	53
4.2.3 Mutationen des <i>WWOX</i> Gens .....	55
4.2.4 Polymorphismen des <i>WWOX</i> Gens .....	55
4.3 Ausblick.....	57
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	58
6 LITERATURVERZEICHNIS .....	59
7 ANHANG.....	70
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	70
7.2 Tabellenverzeichnis .....	72
7.3 Abbildungsverzeichnis .....	74
7.4 Ergebnistabelle.....	75
8 DANKSAGUNG.....	87
9 LEBENSLAUF .....	88

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Inzidenz und Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms

Harnblasenkarzinome sind der zweithäufigste urologische Tumor nach dem Prostatakarzinom. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) standen 2012 Harnblasenkarzinome weltweit mit 429.000 diagnostizierten Fällen an neunter Stelle der malignen Erkrankungen und belegten Platz 13 der krebsbedingten Todesfälle (165.000) (Ferlay et al., 2012). Über 60% der Harnblasenkarzinome finden sich in Nicht-Entwicklungsländern, was die Inzidenzen deutlich zeigen: Die Rate für Männer lag 2012 mit 21,8/100.000 in Südeuropa am höchsten, bei den Frauen stand Nordamerika mit 5,2/100.000 Fällen an der Spitze. Die Mortalitätsraten hingegen waren 2012 in weniger entwickelten Ländern höher, sie lagen für Männer in Westasien (8,4/100.000) und für Frauen in Nordafrika (1,6/100.000) am höchsten (Ferlay et al., 2012). Das Harnblasenkarzinom tritt zwei- bis viermal häufiger beim männlichen Geschlecht auf, wofür unterschiedliche Expositionen von gesundheitsschädlichen Substanzen als Ursache vermutet werden (Matanoski, 1981). Des Weiteren scheint die Ethnie eine entscheidende Rolle zu spielen: Schwarze Amerikaner erkrankten halb so oft wie weiße Amerikaner (Ries et al., 2000). Da das Harnblasenkarzinom bevorzugt ab dem 65. Lebensjahr auftritt, liegt das mediane Alter bei Diagnose derzeit bei 73 Jahren. Mit 30% werden die meisten Harnblasenkarzinome im Alter zwischen 75 und 84 Jahren diagnostiziert. Die allgemeine Überlebensrate für Harnblasenkarzinome liegt derzeit bei 77,4% für 5 Jahre. Abhängig vom Tumorstadium liegt das 5-Jahres-Überleben für oberflächliche Karzinome bei 95,9% und für metastasierte Karzinome bei 5,4% (National Cancer Institute. Bethesda, 2015).

### 1.2 Ätiologie und Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms

Aromatische Amine, Medikamente, Bestrahlungen sowie chronische Entzündungen zählen zu den gesicherten Faktoren, die das Harnblasenkarzinom verursachen. Der deutsche Chirurg Ludwig Rehn beschrieb erstmals 1895 die aromatischen Amine (2-Naphthylamin, Benzidin, Dichlorbenzidin) als Verursacher von Blasenkarzinomen. Mit der Verabreichung von 2-Naphthylamin an Hunde konnte der karzinogene Effekt bewiesen werden (Bonser, 1943). Auf die Exposition von chemischen aromatischen Aminen aus der Industrie (Gummi-, Farb-, Textilindustrie) sind bis zu 25% der Harnblasenkarzinome in westlichen Ländern zurückzuführen (Vineis et al., 1997). Neben industriellen Quellen für aromatische Amine gilt Zigarettenrauch als Quelle von 2-Naphthylamin, was durch Zigarettenrauchanalysen

nachgewiesen wurde (Hoffmann et al., 1969). Der Zigarettenkonsum stellt Risikofaktor Nummer eins für Harnblasenkarzinome dar, da sich unter drei an Harnblasenkarzinom erkrankten Patienten ein Raucher befindet. Beim Zigarettenkonsum spielen Teergehalt und Anzahl der Zigaretten eine entscheidende Rolle (Brennan et al., 2000). Im Vergleich mit Pfeifen- oder Zigarrenrauchen besteht für das Zigarettenrauchen ein weitaus höheres karzinogenes Risiko in Bezug auf diese Krebsart (Pitard et al., 2001). Weitere Risikofaktoren sind die Einnahme des Zytostatikums Cyclophosphamid, des Analgetikums Phenacetin sowie dessen Derivate und Bestrahlungen des kleinen Beckens. Cyclophosphamid verursacht eine hämorrhagische Zystitis durch die bei seiner Verstoffwechselung entstehenden toxischen Metabolite 4-Hydroxycyclophosphamid sowie Acrolein (Brock et al., 1981; Cox, 1979). 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (Mesna) wird heute bei einer Therapie mit Cyclophosphamid als Antagonist präventiv hinzugegeben. Es bildet mit Acrolein einen stabilen Thioether, wodurch Acrolein seine toxische Wirkung verliert (Brock et al., 1981). Das Analgetikum Phenacetin gleicht chemisch der Struktur eines aromatischen Amins. Seine längerfristige Einnahme korreliert mit einem erhöhten Risiko für Urothelkarzinome (Fortuny et al., 2007). Nach Bestrahlungen des kleinen Beckens im Rahmen der Therapie von Zervixkarzinomen traten Harnblasenkarzinome als Zweitmalignome auf, womit eine Korrelation zwischen Bestrahlungen des kleinen Beckens und Harnblasenkarzinomen nachgewiesen werden konnte (Arai et al., 1991). Ein allgemeiner Risikofaktor für die Karzinomentstehung sind Entzündungen (Grivennikov et al., 2010). Chronische Zystitiden können unterschiedlichen Ursprungs sein: Dauerkatheter, Paraplegie (Querschnittläsion) sowie Bilharziose. Eine Studie zeigte erhöhte Raten an Harnblasenkarzinomen bei Paraplegikern mit Dauerkathetern (Groah et al., 2002) und eine aktuelle Studie konnte erhöhte Raten an Harnblasenkarzinomen bei nicht querschnittsgelähmten Dauerkatheterträgern nachweisen. Demnach verursacht der Dauerkatheter die karzinogene Entzündung (Ho et al., 2015). Die Bilharziose oder Schistosomiasis ist Folge einer Infektion mit dem aus Gewässern stammenden Parasiten *Schistosoma haematobium* (Pärchenegel) und ist in Afrika sowie im mittleren Osten endemisch. In Ägypten sollen 16% aller Harnblasenkarzinome auf Bilharziose zurückzuführen sein (Bedwani et al., 1998). Die als karzinogen bekannten Nitrosamine wurden bei mit Schistosomen Infizierten nachgewiesen (Mostafa et al., 1994). Auslöser der Karzinogenese ist die chronische Infektion, die sich von Nitrosaminen getriggert über epitheliale Hyperplasie, Dysplasie und plattenepitheliale Metaplasie bis hin zu einem Plattenepithelkarzinom entwickelt (Hicks et al., 1977). Die Vererbung von Blasenkrebs ist ein



seltenes Phänomen. Eine Studie wies ein 1,5-fach erhöhtes Risiko für Verwandte ersten Grades nach (Goldgar et al., 1994).

### **1.3 Klassifikation des Harnblasenkarzinoms**

Tumoren der Blase können gut- oder bösartig sein, das Ursprungsgewebe kann mesenchymalen oder epithelialen Ursprungs sein. Primäre Blasentumore gehen von der Harnblase aus und wachsen von innen nach außen. Harnblasenkarzinome können bezüglich der Histologie, der Malignität oder des Wachstumsverhaltens in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen. Mit über 90% sind Urothelkarzinome die häufigsten Tumore der Harnblase (Kausch et al., 2007), dagegen ist das Adenokarzinom der Harnblase mit 0,2-2% sehr selten (Anderström et al., 1983). Plattenepithelkarzinome treten in weniger als 3% auf (Kantor et al., 1988), allerdings sind in Ägypten 75% aller durch Bilharziose verursachten Karzinome Plattenepithelkarzinome (El-Bolkainy et al., 1981).

#### **1.3.1 Makroskopie: Lokalisation, Morphologie und Metastasierung**

Harnblasenkarzinome treten in 60-70% der Fälle multifokal auf und finden sich vorwiegend an der Hinter- oder Seitenwand der Blase sowie im Bereich des Trigonum vesicae (Balsendrieck). Morphologisch gesehen werden papilläre und solide Tumoren unterschieden, wobei papilläre Tumoren mit 70-80% den größten Anteil bilden. Ungefähr zwei Drittel der Karzinome wachsen nicht muskelinvasiv. Die Infiltration durch invasive Tumoren fällt unterschiedlich aus und entscheidet über die Prognose (Kausch et al., 2007). Solitäre Lymphknotenmetastasen werden zu 90% im distalen Iliaca-communis-Gebiet beschrieben. Multiple Lymphknotenmetastasen finden sich zu 50% in den obturatorischen Lymphknoten sowie den Nodi lymphatici iliaci interni (Leissner et al., 2004). Organmetastasen treten zumeist in Leber, Lunge und Knochen auf (Wallmeroth et al., 1999).

#### **1.3.2 Staging anhand der TNM-Klassifikation**

Das Staging beschreibt die Tumorausbreitung und wird anhand der TNM-Klassifikation vorgenommen (Riede et al., 2004). Die aktuelle TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1) des Harnblasenkarzinoms erfolgt nach der siebten Version der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) von 2009. Sie dient der Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung auf die

Harnblase in Form der Infiltrationstiefe (T) sowie der Ausbreitung außerhalb der Harnblase in Form des lokoregionären Lymphknotenbefalls (N) und der Fernmetastasen (M). Die Kategorien pT und pN der pathologischen TNM-Klassifikation sind äquivalent zu T und N (Wittekind et al., 2010).

**Tabelle 1: TNM Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (UICC 2009)**

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Ta</b>	Nichtinvasives papilläres Karzinom (oberhalb der Lamina propria)
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ (flacher Tumor in der Mukosa)
<b>T1</b>	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe (Lamina propria infiltriert)
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muskulatur
<b>T2a</b>	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
<b>T2b</b>	Tumor infiltriert äußere Muskulatur
<b>T3</b>	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
<b>T3a</b>	Mikroskopisch
<b>T3b</b>	Makroskopisch (extravesikaler Tumor)
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Prostata/ Uterus/ Vagina/ Becken-/ Bauchwand
<b>T4a</b>	Tumor infiltriert Prostata/Uterus/Vagina
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert Becken-/Bauchwand
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten (Lks)</b>
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Solitärer Befall; größte Ausdehnung befallener Lks<2cm
<b>N2</b>	Multipler Befall; größte Ausdehnung >2cm, aber <5cm
<b>N3</b>	Solitärer/multipler Befall; größte Ausdehnung >5cm
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
<b>MX</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

### 1.3.3 Histopathologisches Grading

Beim Grading wird der Differenzierungsgrad der Tumorzellen zytologisch sowie histologisch beurteilt. Differenzierungsgrad und Infiltrationstiefe sind wichtige Prognoseparameter (Rübben, 2014). Für das histopathologische Grading wurden von der WHO 1973 drei Tumorgade (G1-3) und GX unterschieden. G1 steht für gut differenziert, G2 für moderat

differenziert, G3 für schlecht differenziert und GX für einen nicht beurteilbaren Differenzierungsgrad. Seit 2004 gibt es neue Kriterien zur Beurteilung von Dysplasien und sogenannten intermediären Graden. Die Grade 1 bis 3 wurden zu Low- und High-Grade, des Weiteren gibt es eine Unterscheidung in nichtinvasive und invasive Tumoren. Laut der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) dürfen beide Gradingarten eingesetzt werden (Babjuk et al., 2008).

#### 1.3.4 Histologie

Das Epithel der Harnblase wird als Übergangsepithel oder Urothel bezeichnet. Neben benignen gibt es maligne Transformationen in diesem Epithel. 1998 erarbeitete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit der International Society of Urological Pathology (ISUP) den 2004 von der WHO veröffentlichten Konsens zur Klassifikation nichtinvasiver urothelialer Läsionen (siehe Tabelle 2). Es wurden die vier Kategorien normales Urothel, urotheliale Hyperplasien, flache urotheliale Neoplasien mit Atypien und papilläre urotheliale Neoplasien unterschieden (Epstein et al., 1998). Die erste Stufe zellulärer Veränderungen beschreibt eine Zunahme der Zellen (Hyperplasie), die benigner oder maligner Ausprägung sein kann (Kumar et al., 2010). Verändern sich die Zellen einheitlich ist von Atypie die Rede. Zeigen sich untypische Zellveränderungen sowie ein Polaritätsverlust, handelt es sich um eine Dysplasie (Kumar et al., 2010). Neben der Zellmorphologie wird die Morphologie der urothelialen Läsion beschrieben, welche papillär oder flach sein kann. Flache urotheliale Hyperplasien haben kein malignes Potential (Epstein et al., 1998), für papilläre urotheliale Hyperplasien konnte hingegen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung nicht-invasiver papillärer Urothelkarzinome nachgewiesen werden (Taylor et al., 1996). Diese wiederum sind neben flachen nicht-invasiven Urothelkarzinomen die häufigste Vorläuferläsion invasiver Urothelkarzinome. Carcinoma in situ (CIS) gehören zu den flachen nicht-invasiven Urothelkarzinomen, die die zweite Gruppe der Vorläuferläsionen für invasive Urothelkarzinome bilden (Kumar et al., 2010). CIS weisen Zeichen der Malignität auf ohne Invasion der Basalmembran und werden daher als High-Grade Läsionen eingestuft. Sie sind durch Zellen mit großen, unregelmäßigen hyperchromatischen Nuklei gekennzeichnet, die im gesamten oder einem Teil des Urothels nachweisbar sind (Epstein et al., 1998). Neben einer engmaschigen Nachsorge bei erhöhtem Progressionsrisiko findet eine intravesikale Therapie statt (Kausch et al., 2007). Die Kategorie der papillären urothelialen Neoplasien stellt eine

heterogene Gruppe dar. Papillome sind 0,5 bis zwei Zentimeter groß, wachsen exophytisch und weisen mit normalem Urothel ein äußerst geringes malignes Potential auf. Die invertierten Papillome sind benigne und haben wie die exophytischen Papillome ein geringes Risiko für Rezidive. Papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrigem malignen Potenzial (PUNLMs) tendieren dazu, größer als Papillome zu sein und zeigen keinerlei zytologische Merkmale für Malignität. Sie unterscheiden sich von Papillomen durch ein dickeres Urothel oder diffuse Zellkernvergrößerungen (Kumar et al., 2010). PUNLMs weisen jedoch Rezidiv- und Progressionsraten wie pTaG1-Tumoren auf, weshalb eine Nachsorge mittels Zystoskopie empfohlen wird. Nichtinvasive papilläre Urothelkarzinome (Low- und High-Grade) unterscheiden sich anhand ihrer zytologischen Veränderungen und Stadienprogressionsraten. Hinsichtlich der Rezidivraten gibt es keine großen Differenzen. Daher müssen Tumorsektion und Kontrollzystoskopien erfolgen. Von einem invasiven Urothelkarzinom Stadium T1 spricht man, sobald die Lamina propria infiltriert ist. Bei Infiltration der Muskulatur handelt es sich um T2-Tumoren. Auch hier wird beim Grading in Low- und High-Grade Tumoren unterschieden. Für beide Formen besteht ein hohes Progressions- und Rezidivrisiko, was engmaschige Kontrollen sowie intravesikale Therapien bei T1-Tumoren notwendig machen. Für T2-Tumoren wird die Zystektomie empfohlen (Kausch et al., 2007).

**Tabelle 2: Konsens der World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) für die Klassifikation von urothelialen Läsionen (1998)**

Kategorien	Untergruppierungen
<b>Normales Urothel</b>	- Normal (enthält Fälle, die zuvor als milde Dysplasie bezeichnet wurden)
<b>Urotheliale Hyperplasien</b>	- Flache Urotheliale Hyperplasie - Papilläre Urotheliale Hyperplasie
<b>Flache urotheliale Neoplasien mit Atypien</b>	- Reaktive (inflammatorische) Atypie - Atypie unbekannter Signifikanz - Dysplasie (Low-grade intraurotheliale Neoplasie) - Carcinoma in situ (High-grade intraurotheliale Neoplasie) (enthält Fälle, die zuvor als schwere Dysplasie bezeichnet wurden)
<b>Papilläre urotheliale Neoplasien</b>	- Papillom - Invertiertes Urotheliales Papillom - PUNLMP (Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrigem malignen Potenzial) - Papilläres Low-Grade-Urothelkarzinom (NILGC) - Papilläres High-Grade-Urothelkarzinom (NIHGC)

## 1.4 Genetik des Harnblasenkarzinoms

### 1.4.1 Tumorgenetik

Jeder Mensch besitzt 46 Chromosomen. Bis auf das X und Y Chromosom existiert jedes der anderen 22 Chromosomen doppelt (homologe Chromosomen). Die Ausprägung der Gene auf den Chromosomen nennt man Allele. Der Begriff Allel dient zur Abgrenzung, wenn zwei oder mehr unterschiedliche Varianten vorliegen. Liegt auf den homologen Chromosomen die gleiche Basenabfolge vor, handelt es sich um homozygote Allele. Für die meisten Gene liegen unterschiedliche Ausprägungsformen vor, die sich meist durch einzelne Basenaustausche an definierten Stellen unterscheiden. Die am häufigsten auftretende Ausprägung in einer Bevölkerung wird als Wildtyp bezeichnet. In Abgrenzung dazu werden alle davon abweichenden Versionen neutral als Varianten beschrieben. Besteht eine Variante mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in der Bevölkerung, ist von einem Polymorphismus die Rede. Davon unabhängig sollen Krankheitswert oder Funktion der Variante sein. In Abgrenzung zum Polymorphismus ist der Begriff Mutation zu sehen. Die Mutation beschreibt im ursprünglichen Sinne eine Veränderung und das Produkt, das durch die genetische Veränderung entsteht. Im ärztlichen Sprachgebrauch steht Mutation für seltene Veränderungen oder solche mit Krankheitswert. Eine Mutation kann konstitutionell vorliegen, d.h. sie kommt in allen Körperzellen vor, oder somatisch ausgeprägt sein, d.h. sie tritt auf bestimmte Körperzellen begrenzt auf. Für die Tumorentstehung und Progression sind vor allem somatische Mutationen von Relevanz (Schaaf et al., 2013). Bei der Entstehung von Krebs wird heute von einem Mehrstufenprozess ausgegangen, es bedarf einer Störung der Balance von Zellproliferation, Zellteilung und Zelltod, der Apoptose. Die an der Krebsentstehung beteiligten Gene können in zwei große Gruppen, die Onkogene und die Tumorsuppressorgene, eingeteilt werden. Onkogene, eigentlich Protoonkogene genannt, sind proliferationsfördernd. Aufgrund ihres dominanten Effekts kann ein mutiertes Allel ausreichen und es kommt zu einer übermäßigen oder inadäquaten Expression des Gens. Beispiele für Protoonkogene sind Wachstumsfaktoren, Rezeptoren an der Zelloberfläche, intrazelluläre Signalübertragungssysteme, Transkriptionsfaktoren oder den Zellzyklus bestimmende Komponenten. Die Aktivierung kann durch Punktmutation, Vermehrung von DNA-Abschnitten (Amplifizierung) und Translokationen erfolgen. Ein konkretes Beispiel für Protoonkogene ist die Gruppe der *Ras-Gene* (*Rat sarcoma*). Sie kodieren für Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine, die intrazelluläre Signalkaskaden regulieren.

Während bei Protoonkogenen die Mutation eines Allels ausreichen kann, benötigen Tumorsuppressorgene als Proliferationshemmer die Inaktivierung beider Allele, um ihre Wirksamkeit vollständig zu verlieren. Dies erfolgt meist durch zwei unabhängige Mutationen. Knudson (1971) entwickelte hierzu die Zweischnitt-Hypothese anhand des Retinoblastom Gens. Oft sind größere Deletionen oder chromosomale Veränderungen der Grund für den Allelverlust und seltener Punktmutationen. Der Verlust eines Allels des Tumorsuppressorgens (z.B. durch größere Deletionen) wird als Heterozygotieverlust (Loss of Heterozygosity, LOH) bezeichnet und ist der häufigste Grund für einen second Hit bei erblichen Tumoren. Bekannte Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom- (*Rb*) und *p53* Gen (Schaaf et al., 2013).

#### 1.4.2 Techniken in der molekulargenetischen Analyse bei Tumoren

Um die oben beschriebenen Veränderungen des Genoms während der Karzinogenese zu detektieren, bedarf es unterschiedlicher Analyseverfahren. Das Verfahren richtet sich nach dem zu suchenden strukturellen Äquivalent der Veränderung. Hierbei kann es sich um die Untersuchung einer veränderten Proteinexpression, die konkrete Suche nach einer Mutation in einem Gen oder mehreren Genabschnitten oder nach einer veränderten Methylierung handeln. Die zuvor beschriebene Überexpression von Proteinen durch eine Mutation in dem jeweiligen Gen ist ein häufiges Ereignis bei Karzinomen, die zumeist mit immunhistochemischen Verfahren nachgewiesen wird. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kann numerische Chromosomenveränderungen sowie strukturelle Aberrationen in Form von Translokationen, Deletionen und Amplifikationen detektieren (Werner et al., 1997). Um Mutationen direkt nachzuweisen bietet sich die Gensequenzierung nach der Didesoxymethode von Sanger an, bei der ein DNA-Strang unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) vollständig in seine Basen aufgeschlüsselt wird (Sanger et al., 1977). Sollen gleichzeitig mehrere DNA-Abschnitte untersucht werden, bietet sich die Multiplex PCR (Polymerasekettenreaktion) mit zwei oder mehr Primerpaaren an. Die DNA-Abschnitte vor und nach den Zielsequenzen werden mittels fluoreszenzmarkierten Primern markiert und dienen als Startpunkte der PCR. Die PCR-Produkte werden anhand ihrer Länge und der Fluoreszenzmarkierung nach einer kapillarelektrophoretischen Auftrennung unterschieden. Die Multiplex-PCR wird unter anderem zur LOH-Analyse genutzt. Hierbei dienen spezifische fluoreszenzmarkierte PCR-Primer für polymorphe Markersequenzen (Mikrosatelliten) der Amplifizierung. Mittels Gel- oder

Kapillarelektrophorese können die Größe der PCR-Produkte, die Mikrosatelliteninstabilität und somit LOH nachgewiesen werden (Butler, 2012).

Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger epigenetischer Regulationsmechanismus zur Inaktivierung von Genen. Das Prinzip der PCR zum Nachweis dieser Veränderung besteht aus einer Umwandlung von unmethylierten Cytosinresten zu Uracil mittels Natriumbisulfid. Je nach Ansatz werden Primer, die an methylierter oder unmethylierter DNA binden, verwendet. Mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt eine Auswertung (Arnold et al., 2002). Hypermethylierungen im Promotorbereich gehören zu den epigenetischen Veränderungen. Sie sind neben den Punktmutationen ein häufiges Ereignis in der Tumorentstehung (Stratton et al., 2009).

#### 1.4.3 Tumorgenetik des Harnblasenkarzinoms

Die molekularen Veränderungen des Harnblasenkarzinoms sind nicht vollständig geklärt. Aktuelle Erkenntnisse beschreiben unterschiedliche molekulare Veränderungen für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen. Dabei werden zwei mögliche Wege für höhergradige und invasive Karzinome den nicht invasiven Karzinomen gegenübergestellt. In allen Stadien der Harnblasenkarzinome wurde der Verlust der Heterozygotie (LOH) von 9p21 nachgewiesen, daher ist diese Aberration bedeutend für die Harnblasenkarzinomentstehung. Spruck et al. (1994) konnten zeigen, dass LOH von Chromosom 9 selten bei Carcinoma in situ sowie Dysplasien auftrat, dafür oft in papillären Tumoren (Ta). Reziprok verhielt es sich für das Tumorsuppressorgen *p53*. Invasive Harnblasenkarzinome (T>1) zeigten Deletionen für den Tumorsuppressor *p53*, welcher auf Chromosom 17 liegt. Signifikant häufiger trat LOH von 17p für Tumoren Grad III und IV auf (Olumi et al., 1990). Auf therapeutischer Ebene konnte ein Vorteil für Patienten mit *p53* Mutationen gefunden werden, da diese Tumoren eine erhöhte Sensitivität für die Chemotherapeutika Doxorubicin und Cisplatin zeigten. Die Chemotherapie bewirkte eine dreimal niedrigere Rezidivrate und 2,6-fach höheres Überleben auf neun Jahre gesehen bei Nachweis von *p53* Mutationen (Cote et al., 1997). Williamson et al. (1995) wiesen bei 38% der primären Tumoren einen homozygoten Verlust des Tumorsuppressors *p16* auf 9p21 nach. Hinsichtlich einer Korrelation zwischen Über- und Unterexpression und Tumorstadium gab es unterschiedliche Studienergebnisse. Eine Überexpression von *p16* wurde bei High-Grade Tumoren nachgewiesen und als Hilfsmittel in der Diagnostik invasiver Urothelkarzinome empfohlen (Nakazawa et al., 2009).

Ein weiterer entscheidender Tumorsuppressor ist das Retinoblastom-Protein (pRB), dessen Gen auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14) liegt. In dieser Region sind auch häufig Deletionen beim Harnblasenkarzinom beschrieben worden. Das pRB spielt eine entscheidende Rolle im Zellzyklus; der Grad seiner Phosphorylierung entscheidet über Zellteilung (bei starker Phosphorylierung) oder Apoptose (bei geringer Phosphorylierung). Es wird wiederum durch p16 reguliert, da es ohne p16 zu ungehinderter Phosphorylierung des pRB und erhöhten Zellteilungsraten kommt. Benedict et al. (1999) konnten eine Korrelation zwischen der pRB Expression und dem Status von *p16* nachweisen: Harnblasenkarzinome mit LOH von 9p21 zeigten keine *p16* Expression, aber erhöhte Expression des Retinoblastomgens. Die fehlende *p16* Expression erklärte sich anhand von Deletionen und Mutationen des für p16 codierenden *CDKN2* Gens. Diese Aberrationen sorgten für die Entstehung von Stoppcodons mit daraus resultierender verminderter Proteinexpression von p16. Andersherum zeigte sich immunhistochemisch vermehrt eine *p16* Überexpression bei für pRB negativen Harnblasenkarzinomen (Benedict et al., 1999). Cordon-Cardo et al. (1992) wiesen für muskelinvasive Harnblasenkarzinome mit verminderter Expression des Retinoblastom-Proteins eine Korrelation ( $p < 0,001$ ) mit einem verminderten Fünf-Jahres-Überleben nach. Eine andere Studie zeigte bei invasiven Urothelkarzinomen für Überexpression und nicht vorhandene pRB Expression statistisch signifikant höhere Rezidivraten sowie schlechtere Überlebensraten. Des Weiteren wies diese Studie einen synergistischen Effekt bei gleichzeitig veränderter p53 und pRB Expression auf die Tumorprogression nach (Cote et al., 1998).

Auch auf Ebene der Onkogene zeigten sich Mutationen bei Harnblasenkarzinomen: Serizawa et al. (2011) untersuchten Harnblasenkarzinome auf Mutationen im Fibroblasten-Wachstums-Rezeptor 3 Gen (engl. Fibroblast growth factor receptor, FGFR) und damit korrelierende Hypermethylierungen im Promotor Bereich. Es zeigten sich *FGFR3* Mutationen vor allem in low grade und low stage Tumoren. Durch die epigenetischen Veränderungen kann es zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, sowie zur Aktivierung von Protoonkogenen wie *FGFR3* kommen.

Die Inaktivierung von *FHIT1* wurde häufig bei Karzinomen beobachtet (Croce et al., 1999). Dies wird darauf zurückgeführt, dass auf *FHIT1* das common Fragile Site (cFS) *FRA3B* liegt. cFSs sollen anfälliger für Deletionen, Brüche sowie Umordnungen von Chromosomen sein (Huebner et al., 2001). Iliopoulos et al. (2005) untersuchten *FHIT* und WW domain containing oxireductase (*WWOX*) auf Inaktivierungen anhand von Hypermethylierung und der Proteinexpression. Die nachgewiesenen Hypermethylierungen gingen mit veränderten

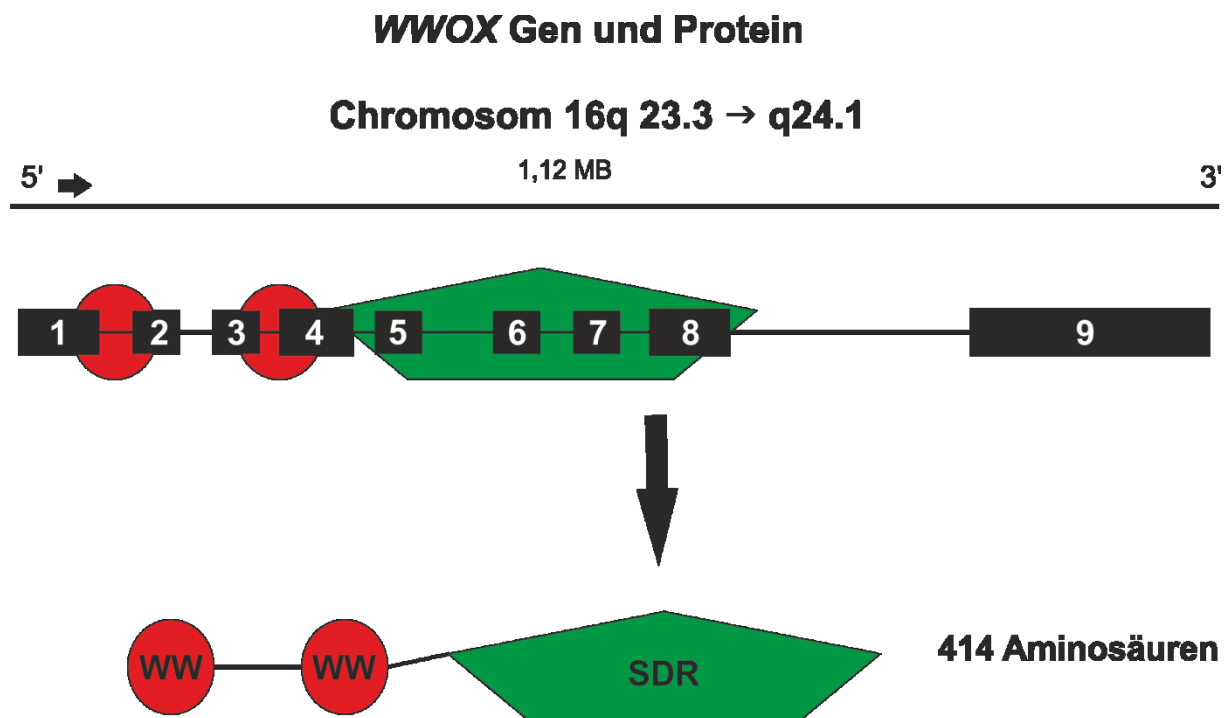


Expressionen von *WWOX* und *FHIT* einher. Für das nicht-neoplastische Gewebe wurden keine Hypermethylierungen und normale Proteinexpressionen beschrieben.

#### 1.4.4 Das *WWOX* Gen

Veränderungen von Chromosom 16q bei epithelialen Tumoren sowie LOH des langen Arms von Chromosom 16 führten zu der Annahme, dass in dieser Region ein Tumorsuppressorgen liegen könnte. Bednarek et al. (2000) entdeckten auf dem Chromosomenabschnitt 16q23.3–24.1 ein 1,1 Mb (Megabasen) großes Gen mit neun Exons, das für ein aus 414 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert, welches sie aufgrund seiner zwei WW-Domänen und seiner Ähnlichkeit zur Short-chain-dehydrogenase (SDR) als WW domain containing oxireductase bezeichneten (siehe Abbildung 1) (Bednarek et al., 2000). Die WW-Domäne ist eine Proteindomäne, ein sogenanntes Kopplungselement, welches der intrazellulären Signaltransduktion durch Protein-Protein-Interaktionen dient. WW-Domänen bestehen aus 35-40 Aminosäuren und sind durch eine kompakte dreisträngige antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur charakterisiert, die zwei konservierte Tryptophan-Reste im Abstand von 26 Basenpaaren (bp) enthält (Doneke et al., 2005). W steht im Einbuchstabencode für die Aminosäure Tryptophan. Bei dem von Bednarek gefundenen Genabschnitt war bei der zweiten W-Domäne ein Tryptophan durch Tyrosin ausgetauscht, ein für WW-Proteine üblicher Austausch (Bednarek et al., 2000). Die Faltspalte des Proteins dient bei WW-Domänen zur Bindung anderer Proteine mit Prolin-Resten, daher weisen sie eine Ähnlichkeit zu Src-homology (SH) 3-Domänen auf. Die SDR-Familie umfasst eine große Gruppe an oxidierenden Enzymen mit zwei konservierten Domänen, eine für den Kofaktor und eine für die Substratbindungsstelle. Das OX in *WWOX* steht folglich stellvertretend als Abkürzung für Oxireduktase. *WWOX* wurde gleichzeitig als *FOR* (fragile site *FRA16D* Oxidoreductase) Gen bekannt, da es auf dem common Fragile site *FRA16D* liegt (Ried et al., 2000). Der Wildtyp von *WWOX* wurde im Golgi Apparat nachgewiesen, wohingegen die mutierte Form im Zellkern auftrat (Bednarek et al., 2001). In normalem Gewebe wurde *WWOX* in sekretorischen epithelialen Zellen von reproduktiven endokrinen und exokrinen Organen sowie duktalem epithelialen Zellen in harnableitenden Organen vorwiegend hoch exprimiert nachgewiesen. Weitere signifikante Proteinexpressionen von *WWOX* zeigten sich für Zellen neuronalen Ursprungs wie Ependymzellen und Astrozyten. Keinerlei Expression zeigte sich

hingegen in Fett-, Binde-, und Lymphgewebe sowie myelinisierten Strukturen und Blutgefäßen (Nunez et al., 2006).



**Abbildung 1:** Schema des *WWOX* Gens und Proteins: Das Gen (1,12 MB) besteht aus neun unterschiedlich großen Exons und acht Introns. Das Protein (414 Aminosäuren) enthält zwei WW-Domänen und eine Short-chain-dehydrogenase (SDR). Die Exons 1-4 kodieren für die WW-Domänen, die Exons 4-8 für die SDR. Verändert nach Chang et al. 2010.

Viele Studien beschäftigten sich seitdem mit der Expression von *WWOX* in Tumorgewebe. Im Vergleich mit Lungen- und Mammakarzinomen zeigten Urothelkarzinome eine heterogene *WWOX* Proteinexpression. Hinsichtlich des Methylierungsstatus im Promotorbereich und Exon 1 zeigte sich für Urothelkarzinome ebenfalls eine heterogene Verteilung. Allerdings wiesen sie im Vergleich mit Lungen- und Mammakarzinomen geringere Methylierungsraten auf (Iliopoulos et al., 2005). Ramos et al. (2008) wiesen für Urothelkarzinome mit reduzierter *WWOX* Proteinexpression statistisch signifikante Korrelationen mit höherem histologischen Grad ( $p < 0.001$ ), fortgeschrittenem Stadium ( $p < 0.002$ ), der Tumorgroße ( $p < 0.04$ ), sowie der Karzinomprogression ( $p < 0.028$ ) nach. Urothelkarzinome mit Plattenepithelmetaplasien zeigten hierbei die niedrigsten Werte der *WWOX* Proteinexpression. Eine weitere signifikante Korrelation zeigte sich für den Verlust der *WWOX* Expression mit einem kürzerem progressionsfreien Überleben ( $p < 0.042$ ).

In einer aktuelleren Studie wurden signifikante Korrelationen für LOH und den Methylierungszustand von *WWOX* zu reduzierter Proteinexpression nachgewiesen. Diese

Studie wies mit LOH und Hypermethylierung der Promotorregion auf zwei unterschiedliche Mechanismen für reduzierte WWOX Proteinexpression bei Urothelkarzinomen hin (Pluciennik et al., 2014).

Gardenswartz und Aqeilan (2014) stellten in ihrem Review mit genomischen, epigenetischen und posttranslationalen Veränderungen drei Regulationsmechanismen gegenüber, die zu veränderter WWOX Proteinexpression führen: Genomische Aberrationen beinhalten LOH und homozygote Deletionen, welche in Geninaktivierungen resultieren. Epigenetische Veränderungen, wie die Promotorhypermethylierung verursacht Gen-Stillegung oder Chromatin-Kondensation. Posttranslationale Modifikation äußert sich durch Abbau von WWOX nach Polyubiquitinierung. Sie beschrieben in ihrem Review verminderte bis gar keine WWOX Proteinexpressionen für unzählige Karzinomformen. Ein weiteres Review beschrieb unter anderem eine Korrelation zwischen WWOX Expressionsdefizit bei Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomen (Lewandowska et al., 2009).

### **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist, Mechanismen besser zu verstehen, die auf genetischer Ebene an der Entstehung von Harnblasenkarzinomen beteiligt sind. Dazu wurden in Paraffin fixierte Gewebeproben von Tumoren auf folgende Veränderungen hin untersucht: Mittels Immunhistochemie wurde die Expression des Tumorsuppressorgens *WWOX* bestimmt. Die Multiplex-PCR wurde zur Heterozygotieanalyse der vier Mikrosatelliten Loci D16S3096, D16S3029, und D16S504 im Intron 8, und D16S518 im Exon herangezogen. Die Suche nach Mutationen und Varianten in den Exons 1 bis 9 von *WWOX* erfolgte mittels Sequenzierungs-PCR. Die erhobenen Daten wurden schließlich statistisch miteinander und in Zusammenschau mit den Tumorstadien und auch den klinischen Daten ausgewertet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Untersuchungsgut

Die in dieser Studie untersuchten 114 Gewebeproben stammten aus der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Rostock aus den Jahren 2008 bis 2011. Die Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken unter Wahrung der Anonymität erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Rostock gemäß der Deklaration von Helsinki und der Datenschutzregelung der medizinischen Fakultäten der Universitäten Rostock und Duisburg-Essen.

Alle im Folgenden nicht näher spezifizierten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### 2.2 Immunhistochemie und Antikörper

Sämtliche immunhistochemische Untersuchungen und ihre Auswertung wurden von Frau PD Dr. Britta Kleist und Frau Bioing Christiane Lolandam Department of Pathology, Soerlandetsykehus HF in Kristiansand, Norwegen, durchgeführt.

#### 2.2.1 Material

##### Verwendete Antikörper:

WWOX Kaninchen Antikörper	ab33248, Abcam, Cambridge, United Kingdom
---------------------------	--

##### Chemikalien:

Tris- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Puffer	
Diaminobenzidin (DAB) Tetrahydrochlorid	
Envision Anti-Rabbit Kit	Dako, Glostrup, Dänemark

##### Geräte:

Tissue microarray (TMA) Paraffinblock
Tissue Arrayer/ Gewebe Matrix
Wärmeschrank

---

Autostainer	Dako
PT Link	Dako
Mikroskop, Zeiss Axioplan	Zeiss West Germany

### 2.2.2 Methode allgemein

Immunhistochemie beschreibt das Prinzip einer enzymatischen Reaktion zur Sichtbarmachung von Antigen-Antikörperreaktionen im Gewebe. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt durch Affinität von Antikörpern (AKs) zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft, Epitop genannt (z.B. Aminosäuregruppen innerhalb von Proteinen). Der Idealfall beschreibt eine spezifische und starke Bindung zwischen Antikörper und Epitop am Gewebeschnitt. Die Antikörper werden durch Ankopplung farbloser Chromogene, die zum Beispiel durch Peroxidase oxidiert und in eine farbige Substanz umgesetzt werden, sichtbar gemacht. Bereits geringe Mengen an Epitop können durch moderne Detektionssysteme verstärkt dargestellt werden. Ziel ist es, das Signal nur am Ort des Epitops zu erkennen.

Diese indirekte Methode (Zwei-Schritt-Methode) ist sensitiver aufgrund ihrer Signalamplifikation. Das Gewebe wird zunächst mit einem unkonjugierten Primär-AK, dann mit einem enzymmarkierten Sekundär-AK (gegen den Primär-AK) inkubiert. Durch die Bindung mehrerer polyklonaler Sekundär-AKs an den Primär-AK entsteht das verstärkte Signal (Coons et al., 1955; Lang, 2013).

### 2.2.3 Methode speziell (Dako Protokoll)

Nach dem Stanzen des Tumorgewebes mit dem Tissue Arrayer erfolgte das Einbetten in einen TMA Paraffinblock. Von den Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte abgetragen und auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit den Gewebestanzen mindestens eine Stunde bei 60°C im Wärmeschränk gelagert, um ein späteres Abschwimmen von den Objektträgern während der immunhistochemischen Untersuchungen zu verhindern.

Für die immunhistochemische Untersuchung wurde der polyklonale WWOX Antikörper 1:50 verdünnt und auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer initialen Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Demaskierung mittels HIER (Heat Induced Epitop Retrieval) durchgeführt. Hierbei wurde unter Benutzung des vorgewärmten (65°C) Tris-EDTA (pH 9) die Permeabilität des fixierten Gewebes erhöht, wodurch die Epitope freigelegt

wurden und nun für die Bindung von Antikörpern zugänglich waren. Die Demaskierung wurde im PT Link durchgeführt. Hierbei dauerten die Aufwärmphase und die Heizphase jeweils 20 Minuten, die Ruhephase betrug 30 Minuten. Die maximale Heiztemperatur lag bei 97°C. Als Positivkontrollen wurde nicht-tumoröses Haut- und Hodengewebe verwendet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Antikörper.

Die Visualisierung erfolgte mit einem Zweistufen-Polymerkonjugat. Hierfür erfolgte zunächst eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem DAB-Envision Anti-Rabbit Kit. Anschließend wurden die Gewebeproben mit dem Chromogen Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid sieben Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die anschließenden Analysen wurden auf einem Dako Autostainer durchgeführt.

### 2.2.3.1 Auswertung

Für jede Immunfärbung wurde die Immunreaktion mittels einer modifizierten Methode nach Ramos et al. (2008) durch den Vergleich zwischen der Farbintensität des Tumorgewebes und der positiven Kontrolle quantifiziert. Tumorfremie Haut- und Hodenproben wurden als Positivkontrollen eingesetzt und für die Negativkontrolle wurde der primäre Antikörper entfernt. Die WWOX Expression wurde eingeteilt in negativ (0), gering (1 - 2), moderat (3-4) und hoch (>4).

Als positives Resultat wurde sowohl eine Färbung im Zytoplasma als auch in den Kernen akzeptiert.

## 2.3 DNA-Extraktion

### 2.3.1 Material

Xylol	Hausapotheke
100 % Ethanol	Hausapotheke
Aqua.dest.	Hausapotheke
InnuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Vortex	IKA, Staufen, Deutschland
Zentrifuge (Galaxy 16 DH)	VWR-International, Darmstadt, Deutschland

### 2.3.2 Methode allgemein

Um DNA zu extrahieren, müssen die Zellen des jeweiligen Gewebes zerstört und störende Komponenten entfernt werden.

### 2.3.3 Laborprotokoll

#### 2.3.3.1 *Vorbehandlung des gefrorenen Gewebes*

Die bei der Operation entnommenen Blasentumore wurden direkt bei -20 °C eingefroren und in gefrorenem Zustand verschickt. Als Vorbehandlung für die DNA-Extraktion wurde das Gewebe leicht angetaut und dann kontaminationsfrei mit einem Skalpell in ca. 8 mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.3.3.2 *Herstellung der Paraffinschnitte und Identifikation des tumorhaltigen Gewebes*

Von den in Paraffinblöcken vorliegenden Primärtumoren wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mikroskopisch die Tumorareale markiert. Für die DNA-Extraktion wurden anschließend von denselben Blöcken mehrere 10 µm dicke Schnitte hergestellt und die Markierung der Tumorareale übertragen. Das gesunde Gewebe wurde entfernt.

#### 2.3.3.3 *Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte*

Die Entparaffinierung erfolgte durch Xylol. Die Rehydrierung des Gewebes verlief wie unten stehend mit absteigender Ethanol-Konzentration.

Xylol	3 x 3 Minuten
100% Ethanol	3 x 3 Minuten
90% Ethanol	2 x 3 Minuten
80% Ethanol	2 x 3 Minuten
70% Ethanol	1 x 3 Minuten
50% Ethanol	1 x 3 Minuten
Aqua. dest.	2 x 3 Minuten

Anschließend wurden die Schnitte auf dem Objektträger in kleine Stücke zerschnitten und diese in ein Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.3.3.4 *Aufarbeitung (DNA-Isolierung, -Aufreinigung und -Elution) des Tumorgewebes mittels InnuPREP DNA Mini Kit*

- 400 µl Lysesolution (TLS) und 25 µl Proteinkinase K in das Reaktionsgefäß mit Tumorgewebe pipettiert
- Gemisch 5 Sekunden gevortext
- Inkubation bei 50°C im Wasserbad bis zur vollständigen Lyse der Probe
- Vorheizen des Wasserbads auf 90°C, 60 minütige Inkubation bei 90°C im Wasserbad
- Hinzufügen von 400 µl Bindungssolution (TBS), 15 Sekunden gevortext
- Spin Filter auf blaue 2,0 ml Auffangbehälter aufgebracht, Proben auf Spin Filter pipettiert, Verschluss des Tubes
- 2 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, Verwerfen des Auffangbehälters
- Spin Filter auf neuen Auffangbehälter gesetzt, 500µl Waschsolution (HS) hinzu pipettiert
- 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert, Verwerfen des Auffangbehälters
- Spin Filter auf neuen Auffangbehälter gesetzt, 750 µl Waschsolution (MS) hinzu pipettiert
- 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert, Verwerfen des Auffangbehälters
- Spin Filter auf neue Auffangbehälter gesetzt, 2 Minuten bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert (Entfernung des verbliebenen Ethanol), Auffangbehälter verworfen
- Spin Filter auf 1,5 ml Tube gesetzt, 50-100µl Elution Puffer hinzugegeben, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert
- 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert, Verwerfen des Spin Filters
- Bei unzureichender DNA-Menge Wiederholung der vorherigen Schritte
- aufgefangenes Eluat enthält extrahierte DNA

## 2.4 **DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### 2.4.1 Material

Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	T1 Thermocycler, Biometra
Thermocycler	FlexCycler, Analytik Jena
Amplitaq Gold	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
dNTPs	Promega, Mannheim, Deutschland



---

Puffer	Applied Biosystems
Primer	Biomers, Ulm, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems

#### 2.4.2 Methode allgemein

Die 1986 von K. Mullis veröffentlichte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung bestimmter DNA- oder RNA-Abschnitte. Diese als Amplifikation beschriebene Methode erfolgt in drei Schritten und benötigt die im Folgenden aufgeführten Komponenten: Ausgangsprodukt der PCR ist die DNA, welche vervielfältigt werden soll bzw. den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält. Um den zu amplifizierenden Abschnitt zu markieren und einen Start- und Endpunkt zu setzen, sind zwei komplementäre Oligonukleotid-Primer erforderlich. Es handelt sich hierbei um DNA- oder RNA-Moleküle, die aus ca. zwanzig bis dreißig Nukleotiden bestehen. Die DNA-Polymerase muss hitzestabil sein und repliziert den durch die Primer markierten Abschnitt. Als Bausteine für die zu amplifizierende DNA dienen Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP). Des Weiteren zählen Magnesiumionen und Puffer zu den Komponenten. Die Reaktionen laufen in einem Thermocycler in vorprogrammierten Schritten (PCR-Programm) ab. Jeder Schritt ist durch eine Temperaturänderung gekennzeichnet. Der erste Schritt ist die Denaturierung der DNA, die Trennung der Doppel- in Einzelstränge. Dies geschieht bei 95°C. Anschließend folgt das Annealing, die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge bei 55°C. Dieser Schritt wird auch als Hybridisierung bezeichnet. Der dritte und letzte Schritt ist die Extension, welche die Bildung des komplementären Strangs beschreibt (Mullis et al., 1986). Die Temperatur wird (meist) auf 72°C erhöht, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Polymerase synthetisiert durch Einbau der Desoxynukleotide ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung die Zielsequenz. Nach den ersten drei Amplifikationszyklen erhält man die Zielsequenz. In der Theorie kann die Amplifikation beliebig oft erfolgen. Doch in der Praxis stellt sich nach zwanzig bis dreißig Zyklen exponentiellen Wachstums ein Plateau ein, trotz hitzestabiler Taq-Polymerase.

### 2.4.3 Methode speziell

#### 2.4.3.1 Analyse des Heterozygotieverlusts mittels Multiplex-PCR

Die Methode der Multiplex PCR wurde bereits unter 1.4.2 erläutert. Um einen Heterozygotieverlust (LOH) zu finden, wurden die zuvor untersuchten Mikrosatellitenmarker in einer Multiplex-PCR zusammengestellt (Ansatz siehe Tabelle 3; Thermocyclerprogramm siehe Tabelle 4). Aus der Genome Data Base (<http://www.gdb.org>) wurden die verwendeten Primersequenzen (siehe Tabelle 5) entnommen.

**Tabelle 3: LOH-Multiplex-PCR Ansatz**

<b>PCR-Ansatz</b>	ad 12,5 µl H <sub>2</sub> O
<b>Reagenz:</b>	<b>Konzentration:</b>
DNA	2 - 5 ng
PCR-Puffer	1x
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	200 µmol je dNTP
Primer A + B	je 0,1 µmol
AmpliTaQ Gold	1 Unit
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µmol

**Tabelle 4: LOH-Multiplex-PCR Thermocyclerprogramm**

Thermocyclerprogramm	Temperatur (°C)	Dauer
Aktivierung der AmpliTaQ Gold	95	8 min
30 Zyklen: Denaturierung	96	30 s
Annealing	55	1 min
Elongation	72	2 min
Abschluss	60	60 min

**Tabelle 5: LOH-Multiplex-PCR Primer I und II**

Mikrosatellitenloкус		Markierung
<b>D16S3029</b>	F:5' ATAGAGTTGGGCTGCATAGA R:5' CTTTCCTGAAATTGGAAGTGA	6-FAM
<b>D16S3096</b>	F:5' GATCTGGCTTACGATGATTCTAAC R:5' CCGTGATGATGTCTGCAAC	6-FAM
<b>D16S504</b>	F:5' AGCTTGTTTCAGGGAAACC R:5' CAGGGATGTAGGACGTAGG	JOE
<b>D16S518</b>	F:5' GGCCTTTTGGCAGTCA R:5' ACCTTGGCCTCCCACC	TAMRA

#### 2.4.3.2 Analyse der einzelnen Exons von WWOX mittels Singleplex PCR

Zur Untersuchung der einzelnen Exons auf Mutationen wurden für die Amplifikation der vollständigen Exons 1 bis 9 sowie Exon-Intron-Bounderies Singleplex PCRs durchgeführt. Exon 8 musste wegen seiner Größe in zwei (sich überlappende) Abschnitte geteilt werden.

Tabelle 6 beinhaltet den Ansatz für die Singleplex PCRs. Die Primersequenzen, die Annealingtemperatur sowie die  $MgCl_2$ -Konzentration sind in Tabelle 7 dargestellt. In Tabelle 8, in Tabelle 9 und in Tabelle 10 finden sich die Zeiten und Zyklen der jeweiligen PCRs.

**Tabelle 6: *WWOX* Singleplex-PCR Ansatz**

PCR- Ansatz	ad 12,5µl H <sub>2</sub> O
<b>Reagenz:</b>	<b>Konzentration:</b>
DNA	2 – 5 ng
PCR-Puffer	1x
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	200 µM je dNTP
Primer A + B	Je 0,1 µmol
AmpliTaQ Gold	1 Unit

**Tabelle 7: Primersequenzen und PCR-Bedingungen**

<i>WWOX</i> Exon	Primersequenz	Annealingtemperatur (°C) und Programm	MgCl <sub>2</sub> - Konzentration (mM)
1	A5'TTTGGAGCGGGAGTGAGTT	55-A	1,5
1	B5'TGTGCAGGGTCCCAGGTG	55-A	1,5
2	A 5'GTCCTCCTTTCTCCTTCTTCC	52-B	1,5
2	B 5'AGAGAGGTGACAGGTGTAATTG	52-B	1,5
3	A5'TTCCTGACCCAGGGATGGT	60-C	1,5
3	B5'AAGCAAAACAGCTGAGAGTGG	60-C	1,5
4	A 5'AAATGCCTGTGTTTCATTGCTGT	55-A	1,5
4	B5'AAATGCCTGTGTTTCATTGCTGT	55-A	1,5
5	A5'AAATGCCTGTGTTTCATTGCTGT	52-B	1,5
5	B5'GATTTTCAGTGGAGTGTGT	52-B	1,5
6	A5'ATTAAACAGGGGAATCCGAC	55-A	1,5
6	B5'CAGATGAACACAATTGGGAGA	55-A	1,5
7	A5'ACATCACATGGATTCCCGAA	55-A	1,5
7	B5'TGGTATGAGAAAGGGGATAAG	55-A	1,5
8.1	A5'AAAAGCTGTGTGGGAAGTCA	55-A	1,5
8.1.	B5'ATGCACTGCGTTCGACGT	55-A	1,5
8.2	A5'TCTGCAACATCCTCTTCTCCA	55-A	1,5
8.2	B5'TAGGACCCAAGGTGTTTGCG	55-A	1,5
9	A5'ACGCCATCTCATCACTCCTTT	55-A	1,5
9	B5'ACGCCATCTCATCACTCCTTT	55-A	1,5

**Tabelle 8: Thermocyclerprogramm A: FMO 55**

Thermocyclerprogramm FMO 55	Temperatur (°C)	Dauer
Aktivierung der AmpliTaQ Gold	95	8 min
35 Zyklen: Denaturierung	94	30 sec
Annealing	55	30 sec
Elongation	72	1 min
Abschluss	72	10 min

**Tabelle 9: Thermocyclerprogramm B: FMO 52**

Thermocyclerprogramm FMO 52	Temperatur (°C)	Dauer
Aktivierung der AmpliTaq Gold	95	8 min
35 Zyklen: Denaturierung	94	30 sec
Annealing	52	30 sec
Elongation	72	1 min
Abschluss	72	10 min

**Tabelle 10: Thermocyclerprogramm C: Test 60**

Thermocyclerprogramm Test 60	Temperatur (°C)	Dauer
Aktivierung der AmpliTaq Gold	95	8 min
30 Zyklen: Denaturierung	94	30 sec
Annealing	60	1 min
Elongation	72	1,5 min
Abschluss	72	10 min

## 2.5 Gelelektrophorese und Silberfärbung

### 2.5.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Einschätzung des Erfolgs einer PCR. Sie gibt Aussage darüber, ob ausreichend viel DNA repliziert wurde oder eine Reamplifikation notwendig ist.

#### 2.5.1.1 *Material*

##### Gel:

Acrylamid	Promega
Methylenbisacrylamid	Promega
Tris	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfatlösung	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (Temed)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
100 Base-Pair Ladder	GE Healthcare, Amersham, USA
Bromphenolblau in Tris-Sulfat-Puffer	Merck
Repellsilan beschichtete Glasplatten	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glasplatten	Glaser Universitätsklinikum, Essen
Trägerfolie	GE Healthcare, Falun, Schweden
Filterpapier	Munktell Filter, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Falun, Schweden
Elektrophoresekammer	MultiTempII, MultiDriveXL, Multiphor II, Pharmacia-LKB, Freiburg

Ansatz:

- 6,6 ml 30% PAA, 3% C (29,1 g Acrylamid, 0,9 g Methylenbisacrylamid, ad 100 ml H<sub>2</sub>O)
- 5,0 ml 35 mmol Tris-Sulfat-Puffer (45,4 g Tris ad 1000 ml H<sub>2</sub>O mit 2,15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz. auf pH 9 eingestellt)
- 11,6 ml H<sub>2</sub>O
- 170 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung
- 12 µl Temed-Lösung

*2.5.1.2 Methode allgemein*

Das Gel dient als Träger für die elektrophoretische Trennung. Für die Elektrophorese von DNA kommen Agarose- und Polyacrylamidgele infrage. In diesem Fall wurden Polyacrylamidgele benutzt, weil sie sich durch ein höheres Auflösungsvermögen auszeichnen, d.h. selbst DNA-Stücke mit sehr geringfügigen Längendifferenzen stellen sich unterschiedlich dar. Zur Beurteilung der DNA-Größe dient eine standardisierte Leiter (Ladder), welche mit auf das Gel aufgetragen wird. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Auftrennung der DNA nach ihrer Größe mittels Stromfluss. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Nettoladung des Teilchens (der DNA), der elektrischen Feldstärke und einem Reibungskoeffizienten. Der Reibungskoeffizient setzt sich aus mehreren Komponenten wie Form und Größe der DNA sowie Porengröße des Gels und Viskosität des Puffers zusammen. Da die DNA durch ihre Phosphatreste negativ geladen ist, bewegt sie sich in dem elektrischen Feld vom Minus- (Kathode) zum Pluspol (Anode). Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgt die Silberfärbung des Gels.

*2.5.1.3 Methode speziell*

Das Horizontalgel wurde abhängig von der Probenanzahl vorbereitet und zugeschnitten. Je nach Probenanzahl wurden Filterplättchen in einem gewissen Abstand nebeneinander mit einer Pinzette auf das Gel gelegt. Es war darauf zu achten, dass alle Filterplättchen die gleiche Startkante hatten. Die Leitern und je 3 µl pro PCR-Produkt wurden auf die Filterplättchen pipettiert. Zur Markierung der Pole dienten zwei zurechtgeschnittene und mit Bromphenolblau gefärbte Filterpapiere (Plugs). Diese wurden nach dem Pipettieren zwischen

Gelrand und Filterplättchen jeweils gegenüber auf das Gel aufgebracht. Die Färbung mit Bromphenolblau diente der Visualisierung und Kontrolle der Laufstrecke während der Elektrophorese. Die Trägerfolie samt Gel und Proben wurde in die gekühlte Elektrophoresekammer gesetzt und ausgerichtet. Die Elektroden mussten genau auf den Plugs sitzen. Mit Aufbringen von Anode und Kathode auf das Gel, startete die Elektrophorese (Einstellungen der Elektrophoresekammer: Temperatur: 10°C, Stromstärke: 24mA, Spannung: 750V, Leistung 25W). Die Elektrophorese war nach ca. einer Stunde beendet. Anschließend folgte die Silberfärbung.

### 2.5.2 Silberfärbung

#### 2.5.2.1 *Material*

10% Ethanol

1% HNO<sub>3</sub> (32ml 65% HNO<sub>3</sub> ad 2000ml H<sub>2</sub>O)

H<sub>2</sub>O

0, 2% AgNO<sub>3</sub> (0,4g AgNO<sub>3</sub>+ 200ml H<sub>2</sub>O)

10% Essigsäure

Entwickler (6g Na-Carbonat + 200ml H<sub>2</sub>O) + 200µl 38% Formalin

5% Glycerin- Lösung

Schüttler

IKA, Staufen, Deutschland

#### 2.5.2.2 *Methode allgemein*

Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte sichtbar gemacht. Das Prinzip stammt aus der Fotoentwicklung und „beruht auf der selektiven Anlagerung von metallischem Silber an Proteine“ (Richter, 2003). Die DNA verhält sich ähnlich wie Proteine: Nach Zugabe von Silbernitrat binden die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA. Es entstehen Silberkerne, welche durch ein Reduktionsmittel zu metallischem Silber werden und oxidieren. Dies zeigt sich in Form von braunen bis orangenen Banden. Dieser Schritt muss unterbrochen werden, bevor alle Silberionen zu metallischem Silber reduziert worden sind. Es kommt sonst zu einer äußerst starken Hintergrundfärbung, welche die DNA-Banden überlagert. Der Vorteil einer Silberfärbung ist

ihre mit 01,-1 ng pro Bande große Sensitivität. Ein weiterer Vorteil der Methode ist die Dauerhaftigkeit der Färbung.

### 2.5.2.3 Methode speziell

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, die Plugs entfernt und das Gel für 5 Minuten in eine Glasschale mit 10% Ethanol auf den Schüttler gestellt. Ethanol denaturierte die DNA, sodass die Wanderung im Gel gestoppt wurde. Nach Entfernung des Ethanols wurde 1% HNO<sub>3</sub> auf das Gel gegeben, wodurch die DNA oxidiert wurde. Die Oxidation wurde durch dreimaliges Spülen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Anschließend wurde das Gel mit 0,2% Silbernitrat für 20 Minuten inkubiert sowie anschließend dreimalig mit H<sub>2</sub>O gespült. Zur Reduktion sowie Sichtbarmachung des metallischen Silbers wurde der Entwickler, eine Natrium-Carbonat-Formalin Lösung auf das Gel gegeben. Nach kurzer Zeit stellten sich Banden dar. Um eine Überlagerung der Banden durch eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde die Reaktion mit zehnpromzentiger Essigsäure gestoppt und das Gel mit H<sub>2</sub>O gespült. Für die Haltbarkeit des Gels wurde dieses für 30 Minuten in eine fünfprozentige Glycerin-Lösung gelegt und anschließend gut getrocknet. Im Vergleich zu den Leitern konnte beurteilt werden, ob die PCR-Produkte die richtige Größe hatten. Die Intensität der Banden diente der Mengenabschätzung des DNA-Produkts für die Sequenzierungs-PCR.

## 2.6 Erster Aufreinigungsschritt von PCR-Produkten mit der Clean up Aufreinigung

### 2.6.1 Material

Exonuclease I (je 1,0µl)

Fast AP, Thermosensitive Alkaline Phosphatase (je 2,0 µl)

Thermocycler

TrioBiometra

### 2.6.2 Methode allgemein

Es handelt sich um den enzymatischen Abbau von nicht mehr benötigten sowie verbliebenen Enzymen und Bausteinen der PCR. Die Exonuclease I entfernt übrig gebliebene Primer und Nukleotide (dNTPs), die Phosphatase dephosphoryliert die DNA. Anschließend müssen beide

Enzyme denaturiert und damit inaktiviert werden, damit sie die nachfolgenden Reaktionen nicht behindern.

### 2.6.3 Methode speziell

Es wurden je Singleplex-PCR-Produkt (siehe Kapitel 2.4) 1,0 µl Exonuclease I und 2,0 µl Fast AP zugegeben und anschließend im Thermocycler erst 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 80°C inkubiert.

## 2.7 **Cycle-Sequenzier-PCR**

### 2.7.1 Material

Big Dye Terminator 1.1 Cyclesequencing Kit	Applied Biosystems
Magic Dye	Red Rabbit, Luckenwalde, Deutschland
Primer A (1:100)	Biomers
0,5-3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt	
H <sub>2</sub> O	
Flexcycler	Analytik Jena

### 2.7.2 Methode allgemein

Die Sequenzierung entschlüsselt die Nukleotidabfolge der DNA und dient der Erkennung von Mutationen und Polymorphismen. Bei dem hier verwendeten klassischen enzymatischen Verfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977), der sogenannten Kettenabbruchreaktion werden zur bereits zuvor amplifizierten und aufgereinigten DNA ein Primer, eine DNA-Polymerase, sowie Desoxy- und Didesoxyribonukleosidtriphosphate in einem bestimmten Mischungsverhältnis hinzugefügt und einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterzogen. Die Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) sind je nach Base (ddCTP, ddGTP, ddATP, ddTTP) mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Werden während der PCR ddNTPs anstatt dNTPs eingebaut, stoppt die Synthese, da ddNTPs am 3'C-Atom der Ribose keine OH-Gruppe besitzen und somit keine Bindung eines weiteren Nukleotids erfolgen kann. Der Einbau der ddNTPs erfolgt nach dem Zufall, dadurch entstehen



unterschiedlich lange Fragmente, welche mittels Gel- oder Kapillarelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können.

### 2.7.3 Methode speziell

Das aufgereinigte Produkt aus 2.6 diene als Ausgangsmaterial für die Cycle-Sequenzier-PCR (Ansatz siehe Tabelle 11; Thermocyclerprogramm siehe Tabelle 12).

**Tabelle 11: Sequenzierungs-PCR Ansatz**

PCR-Ansatz Sequenzierung	ad 10 µl H <sub>2</sub> O
<b>Reagenz:</b>	<b>Konzentration:</b>
MagicDye	1 µl
Ready-Reaction-Mix	1 µl
Primer A oder B	2µl
Aufgereinigte DNA	0,5–3µl nach Gelprotokoll

**Tabelle 12: Sequenzierungs-PCR Thermocyclerprogramm**

Thermocyclerprogramm Sequenzierung	Temperatur (°C)	Dauer
Denaturierung	96	1 min
25Zyklen: Denaturierung	96	10 sec
Annealing	50	5 sec
Elongation	60	4 min
Abschluss	4	30 min

## 2.8 Zweiter Aufreinigungsschritt

### 2.8.1 Material

Vortex “whirlmix“	Cenco
Zentrifuge Galaxy 16 DH	VWR
InnuPREPDYE pureKit	Analytik Jena

### 2.8.2 Methode allgemein

Vor der Auswertung der DNA mittels Kapillarelektrophorese muss das PCR-Produkt von überschüssigen Zusätzen wie dNTPs oder Primern der vorherigen Cycle-Sequenzier-PCR gereinigt werden.

### 2.8.3 Methode speziell

In ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß wurde 500µl Dye Removal Buffer pipettiert und das Produkt aus 2.6 dazu pipettiert. Das Gemisch wurde gevortext, in den Spin-Column pipettiert und drei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Filtrat und Auffangbehälter wurden verworfen, der Filter wurde auf ein neues Mikroreaktionsgefäß gesetzt und 12µl H<sub>2</sub>O dazugegeben. Das Ganze wurde fünf Minuten inkubiert und anschließend eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

## 2.9 **Kapillargelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten**

### 2.9.1 Material

Applied Biosystems Inc. (ABI) Prism 310 Genetic Analyzer	ABI
Performance Optimized Polymer (POP)-4 Polymer	ABI
Kapillare (Länge 5 - 47 cm, Ø 50 µm)	ABI
Gene Scan ROX-400 Längenstandard (Fragmentanalyse)	ABI
Gene Scan Version 3.1.2 (Fragmentanalyse)	ABI
Sequencing Analysis Version 5.2 Patch 2 (Sequenzierung)	ABI
Elektrophorese-Wasser	Merck

### 2.9.2 Methode allgemein

Zur Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA wurden die Produkte der Multiplex-PCR bzw. der Sequenzier-PCR in einer POP-4 Polymerlösung durch Anlegen einer elektrischen Spannung nach Ladung (Längenäquivalent) aufgetrennt. Die typische Anlage des ABI Prism 310 Genetic Analyzers besteht aus einer Glaskapillare mit Kühlvorrichtung, zwei Elektroden mit Pufferreservoir, dem Netzgerät, einem Laser sowie einem (Fluoreszenz)-Detektor. In der Glaskapillare befindet sich die Polymerlösung. Die Probe wird in die Kapillare injiziert, die angelegte Spannung sorgt für die Wanderung der Ionen und somit für deren Auftrennung. Die Ionen werden mittels Argonlaser durch ein Fenster in der Kapillare zur Emission von Strahlen unterschiedlicher Wellenlängen angeregt. Der Detektor nimmt diese Strahlung auf und zerlegt sie in die jeweiligen Spektralfarben. Die Computersoftware stellt nun verschiedenfarbige Peaks der einzelnen Basen graphisch dar. Die Unterschiede für Sequenzierung und Fragmentanalyse bestehen in der Software zur Auswertung sowie in der Verwendung eines

internen Längenstandards bei der Fragmentanalyse. Als Vorteile dieser Methode sind zu sehen: Kurze Trennzeiten aufgrund einer höheren elektrischen Spannung, eine hohe Auflösung, direkte Detektion der aufgetrennten Analyte und geringe Probenvolumina (Butler, 2012; Richter, 2003).

### 2.9.3 Fragmentanalyse der LOH-Multiplex-PCR

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: 12 µl H<sub>2</sub>O, 0,5 µl Längenstandard und 1 µl aufgereinigte DNA wurden in spezielle 0,5 ml Caps pipettiert und mit einem Septum verschlossen. Der ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurde nach Betriebsanleitung vorbereitet.

#### Einstellungen:

Injection time	5 s
Injection kV	15 kV
Run kV	15 kV
Run °C	60 °C
Run time	24 min

Die graphische Darstellung der Allele erfolgte mittels einer integrierten Software (Gene Scan), welche die „local southern method“ benutzt.

Um einen Heterozygotieverlust (LOH) nachzuweisen und folglich eine veränderte Zusammensetzung der Allele, musste die Peakhöhe (Allel) im Tumorgewebe um mindestens 50% kleiner sein als im Normalgewebe.

Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{LOH} = \frac{(\text{Peakhöhe Allel 2 Normal} \div \text{Peakhöhe Allel 1 Normal})}{(\text{Peakhöhe Allel 2 Tumor} \div \text{Peakhöhe Allel 1 Tumor})}$$

Werte unter 0,5 oder über 2 lassen auf LOH schließen.

### 2.9.4 Auftrennung der Sequenzier-PCR-Produkte

Die aufgereinigten Proben aus 2.8 wurden in spezielle 0,5 ml Caps für die Kapillarelektrophorese pipettiert. Der Verschluss der Proben erfolgte mit einem eigens für den ABI Prism 310 Genetic Analyzer genutzten Septum, durch welches die Kapillare passte.

Der ABI Prism 310 wurde nach folgenden Bedingungen eingestellt und nach Einsetzen der Proben gestartet (eine Denaturierung der Proben erfolgte nicht).

Einstellungen:

Injection time	60 s
Injection kV	2 kV
Run kV	15 kV
Run °C	50 °C
Run time	20 min

*Sequencing Analysis* war die integrierte Software, welche die Rohdaten aufbereitete und die Sequenzen als farbige Peaks wiedergab. Die Auswertung der Sequenzen verlief im Vergleich mit den publizierten Sequenzen manuell und durch zwei Auswerter unabhängig voneinander.

## **2.10 Statistik**

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Fisher's Exact Test und mithilfe der Statistiksoftware GraphPad QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/welcome.html>). Ein p-Wert von 0,05 oder kleiner wurde als statistisch signifikant angesehen. Des Weiteren wurden Word und Excel von Microsoft verwendet.

### 3 ERGEBNISSE

Von den 114 Gewebeproben konnten alle für die molekulargenetischen Analysen eingesetzt werden. In 84 Proben konnte die Genexpression des WWOX-Gens mittels Immunhistochemie untersucht werden. Bei den restlichen Proben war nicht ausreichend Material vorhanden.

#### 3.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten der untersuchten Urothelkarzinome wurden den Patientenakten entnommen. Die Klassifizierung nach der unter 1.3.2 beschriebenen TNM-Klassifikation und das Grading wurden von PD Dr. Chris Protzel, Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Rostock, und Dr. Christof Kakies, Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Rostock durchgeführt. Keines der Karzinome wies bei Diagnosestellung Fernmetastasen auf. Lymphknotenmetastasen traten in fünf der 114 Fälle auf. Bei der Geschlechterverteilung war das Verhältnis 2,4:1 für Männer zu Frauen. Die vollständigen Daten der einzelnen Patientenproben finden sich im Anhang in der Übersichtstabelle. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Verteilung der T-Stadien und des Tumorgrades in Verbindung mit Rezidiven (Tabelle 13).

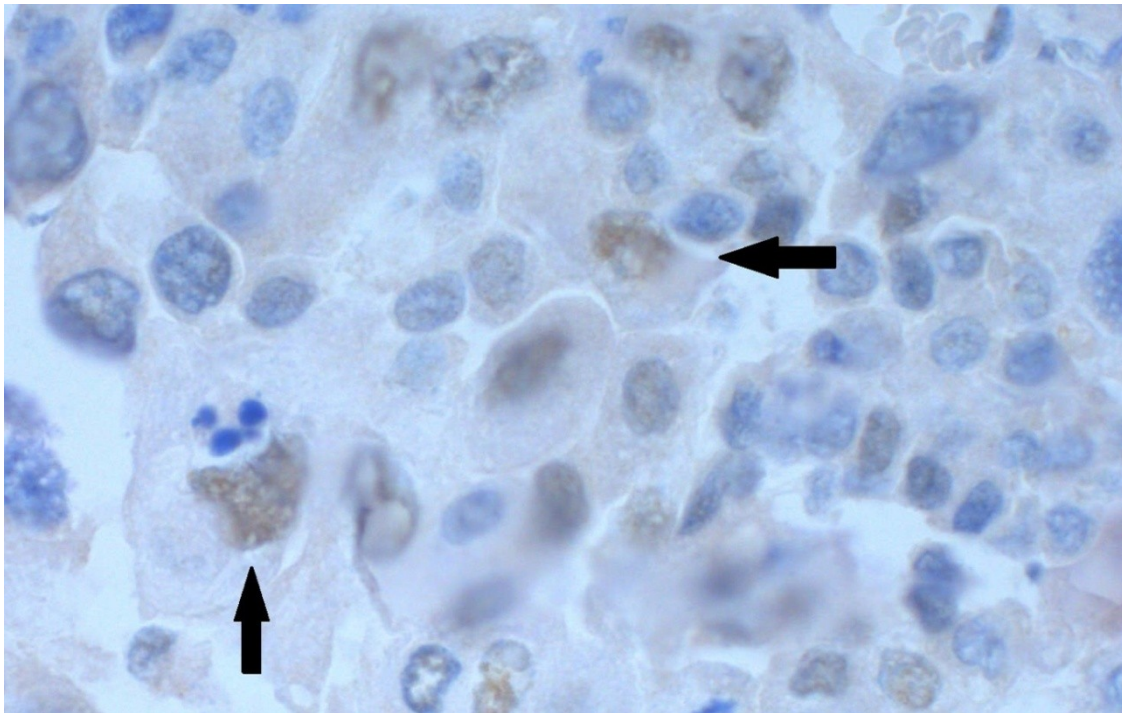
**Tabelle 13: Grading, T-Stadium und Rezidive der untersuchten Urothelkarzinome**

Grading T-Stadium	<b>Gesamt (n=114)</b>	G1	G2	G3	Rezidiv
Ta	<b>44</b>	9	27	8	7
T1	<b>34</b>	0	12	22	6
T2	<b>22</b>	0	2	20	6
T3	<b>13</b>	0	0	13	4
T4	<b>1</b>	0	0	1	0
Rezidiv	<b>23</b>	1	8	14	

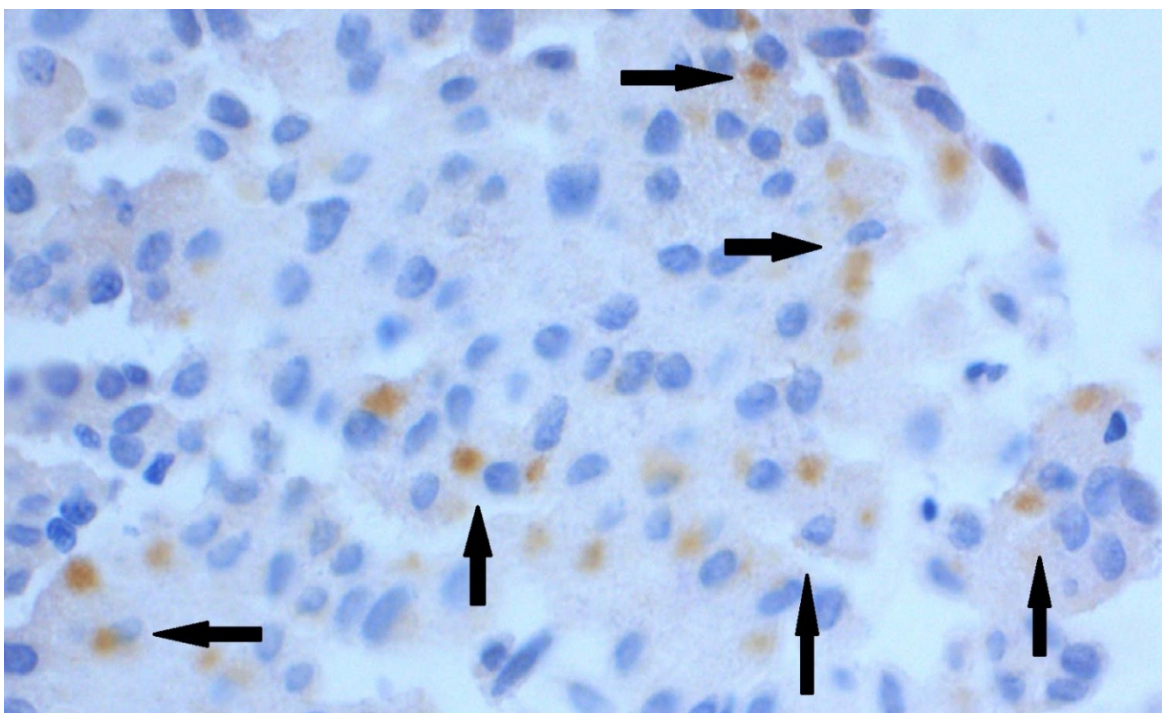
n=Anzahl der Gesamtproben

#### 3.2 Analyse der immunhistochemischen Untersuchungen und Antikörperreaktionen

Die Expression von WWOX war in den 84 analysierbaren Proben insgesamt eher gering. Mehr als die Hälfte der Tumore (43, 51,2%) wies keine WWOX Expression auf (Score 0). Eine schwache Expression zeigten 23 (27,4%) der Proben mit Score 1 und 12 Proben (14,3%) mit Score 2 (Abbildung 2, Abbildung 3). Eine moderate Expression konnte in insgesamt sechs Proben nachgewiesen werden (7,1%). Keine der untersuchten Proben zeigte eine hohe Expression.



**Abbildung 2: Immunexpression des WWOX Proteins bei einem High grade Urothelkarzinom: Die Pfeile zeigen auf Regionen mit schwacher und moderater zytoplasmatischer sowie moderater nukleärer WWOX-Immunfärbung (630 fache Vergrößerung). Erstellt von PD Dr. Britta Kleist.**



**Abbildung 3: Immunexpression des WWOX Proteins bei low grade Urothelkarzinomen: Die Pfeile deuten auf Tumorzellen, die eine überwiegend schwache zytoplasmatische WWOX-Immunfärbung mit fokal starker perinukleärer Akzentuierung zeigen. (400 fache Vergrößerung). Erstellt von PD Dr. Britta Kleist.**

Betrachtete man die Differenzierungskriterien (T-Stadium, Grading, Rezidive) sowie die Ausprägung der WWOX Expression, zeigten sich folgende Auffälligkeiten: Bis auf das T1-Stadium (36% Score 0) zeigte sich innerhalb der einzelnen T-Stadien in mehr als 50% der Fälle keine WWOX Expression. Die WWOX Expression im low Level Bereich (Score 1 und 2) wies innerhalb der T-Stadien für T1-Tumoren den höchsten Anteil auf (39% Score 1, 50% Score 2).

Bei Berücksichtigung des Gradings zeigten sich innerhalb der G2 und G3 Tumoren mit 59,3% und 52% Anteil, die niedrigsten Level der Expression. Der Anteil der G3 Tumoren an den Gesamttumoren lag bei über 60% (52 Karzinome).

Für das Differenzierungskriterium Rezidive war innerhalb der Rezidive in 67% der Fälle keine Expression und innerhalb der Nicht-Rezidiv-Fälle in 47% ein Score 0 zu finden (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Verteilung des Immunscores auf T-Stadium und Grading und Rezidive**

Immunscore	0 (n= 43)	1 (n= 23)	2 (n= 12)	3 (n= 1)	4 (n= 5)	Gesamt (n= 84)
Ta	15	7	5	0	3	30
T1	9	9	6	0	1	25
T2	10	4	1	1	1	17
T3	8	3	0	0	0	11
T4	1	0	0	0	0	1
G1	1	3	1	0	0	5
G2	16	5	4	0	2	27
G3	26	15	7	1	3	52
Rezidiv	12	5	0	0	1	18
Kein Rezidiv	31	18	12	1	4	66

n= Anzahl der für den jeweiligen Immunscore positiven Proben

### 3.2.1 Statistische Auswertung der Immunhistochemie

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen T-Stadium, Grading oder Auftreten eines Rezidivs und den immunhistochemischen Ergebnissen (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Korrelationen von Immunscore mit T-Stadium, Grading und Rezidiven**

	0-1	2-4
Ta-T1	40	15
T2-T4	26	3
p-Wert	0,0955	
G1-2	25	7
G3	41	11
p-Wert	0,1000	
Rezidiv	17	1
Kein Rezidiv	49	17
p-Wert	0,1027	

### 3.3 Analyse des Heterozygotieverlustes (LOH)

#### 3.3.1 Ergebnisse der LOH-Analyse für jeden einzelnen Mikrosatellitenlocus

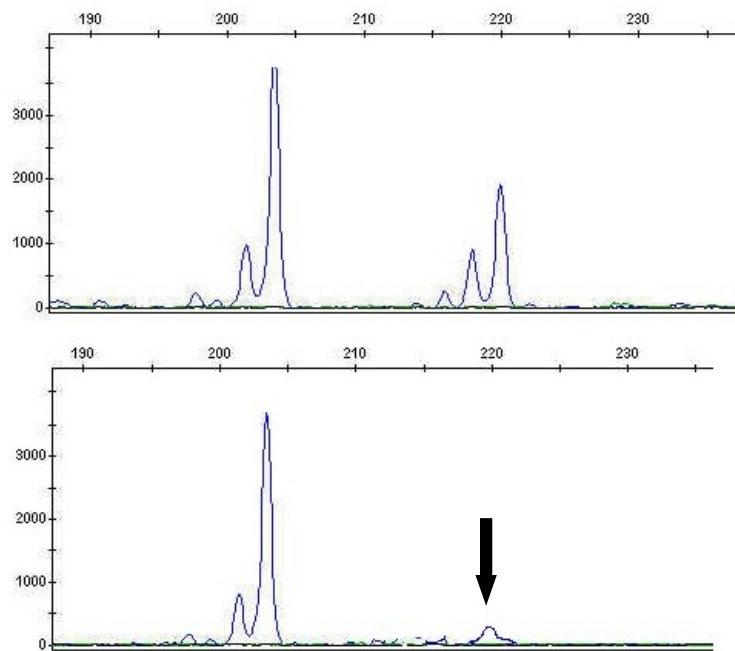
Loss of heterozygosity konnte – über alle Karzinome gesehen – in allen vier untersuchten Loci (D16S3096, D16S3029 und D16S504 im Intron 8, D16S518 im Exon 1) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 16, Abbildung 4 und Abbildung 5).

**Tabelle 16: Übersicht der Karzinome mit LOH: Verteilung in Rezidiven, T-Stadien, Grading, und Immunscore**

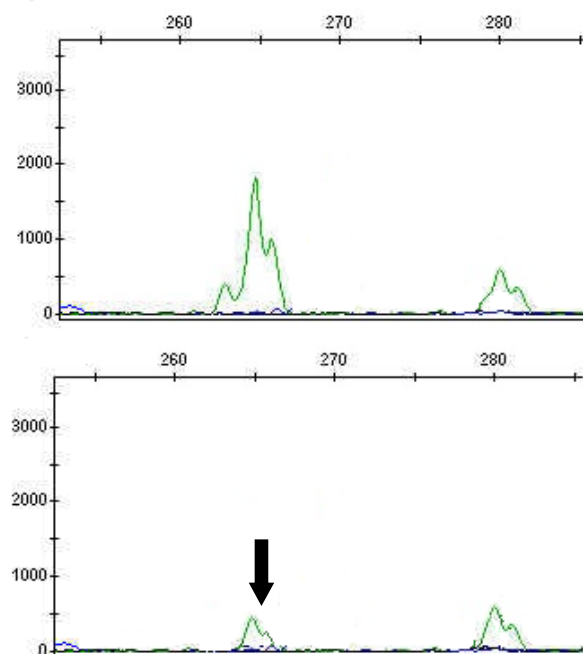
	D16S3096 n = 98	D16S3029 n = 85	D16S504 n = 86	D16S518 n = 92
Ta	14 (von 41)	12 (von 32)	17 (von 30)	15 (von 37)
T1	11 (von 25)	11 (von 24)	13 (von 26)	12 (von 28)
T2	11 (von 21)	11 (von 18)	9 (von 18)	10 (von 17)
T3	3 (von 11)	5 (von 10)	5 (von 11)	3 (von 9)
T4	0 (von 0)	1 (von 1)	1 (von 1)	1 (von 1)
G1	1 (von 8)	1 (von 8)	4 (von 7)	2 (von 6)
G2	17 (von 36)	13 (von 27)	13 (von 27)	13 (von 34)
G3	21 (von 54)	26 (von 50)	28 (von 52)	26 (von 52)
Immunscore				
0	24 (von 35)	24 (von 32)	26 (von 33)	27 (von 33)
1	5 (von 20)	2 (von 14)	4 (von 19)	6 (von 19)
2	3 (von 11)	3 (von 10)	4 (von 8)	2 (von 9)
3	0 (von 1)	0 (von 0)	0 (von 1)	0 (von 0)
4	0 (von 5)	0 (von 5)	1 (von 4)	0 (von 4)
Kein Immunscore	7 (von 26)	11 (von 24)	10 (von 21)	6 (von 27)
Rezidive	8 (von 19)	6 (von 15)	9 (von 19)	7 (von 17)

n = Anzahl der im jeweiligen Locus informativen Proben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Gesamtanzahl der jeweiligen Unterkategorie unabhängig ob mit oder ohne LOH.





**Abbildung 4: LOH in D16S3029 Proben-Nr. 11: Oben gesundes Gewebe mit zwei Peaks, was für Heterozygotie spricht. Unten Tumorgewebe mit einem gleich hohen Peak (links) und einem um mehr als die Hälfte niedrigeren Peak (rechts, Pfeil), was LOH für diese Probe auf dem Mikrosatelliten D16S3029 beweist. (x-Achse: Basenpaare; y-Achse: RFU (relative fluid units)).**



**Abbildung 5: LOH in D16S504 Proben-Nr. 106: Oben gesundes Gewebe mit zwei Peaks, was für Heterozygotie spricht. Unten Tumorgewebe mit einem gleich hohen Peak (rechts) und einem um mehr als die Hälfte niedrigeren Peak (links, Pfeil), was LOH für diese Probe auf dem Mikrosatelliten D16S504 beweist. (x-Achse: Basenpaare; y-Achse: RFU (relative fluid units))**

### 3.3.2 Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf die einzelnen Mikrosatellitenloci

Statistisch signifikante Korrelationen fanden sich nur zwischen der Proteinexpression und LOH im Locus D16S3096 ( $p=0,0128$ ), im Locus D16S3029 ( $p=0,0181$ ) und im Locus D16S518 ( $p=0,0038$ ). LOH im Locus D16S504 zeigte keinerlei statistisch signifikante Korrelation. Weder für T-Stadium und Grading noch für Rezidive wurden statistisch signifikante Korrelationen für Fälle mit und ohne LOH nachgewiesen (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17 Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf die einzelnen Mikrosatellitenloci**

	D16S3096 n = 98	D16S3029 n = 85	D16S504 n = 86	D16S518 n = 92
Ta - T1	25 (von 66)	23 (von 56)	30 (von 56)	27 (von 65)
T2 - T4	14 (von 32)	17 (von 29)	15 (von 30)	14 (von 27)
p-Wert	0,6615	0,1695	0,8226	0,4900
G1 - G2	18 (von 44)	14 (von 35)	17 (von 34)	15 (von 40)
G3	21 (von 54)	26 (von 50)	28 (von 52)	26 (von 52)
p-Wert	1,000	0,3774	0,8262	0,2915
Rezidiv	8 (von 19)	6 (von 15)	9 (von 19)	7 (von 17)
Nein	31 (von 79)	34 (von 70)	36 (von 67)	34 (von 75)
p-Wert	1,000	0,5825	0,7953	0,7938
Immunscore				
0-1	29 (von 55)	26 (von 46)	30 (von 52)	33 (von 52)
2-4	3 (von 17)	3 (von 15)	5 (von 13)	2 (von 13)
p-Wert	<b>0,0128</b>	<b>0,0181</b>	0,2335	<b>0,0038</b>

n = Anzahl der im jeweiligen Locus informativen Proben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Gesamtanzahl der jeweiligen Unterkategorie unabhängig ob mit oder ohne LOH.

### 3.3.3 Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus

In 68 der 114 Proben trat in mindestens einem der vier untersuchten Mikrosatellitenloci ein Heterozygotieverlust auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18: Übersicht für T-Stadien, Grading, Immunscore und Rezidive der Karzinome in Bezug auf LOH in mindestens einem Locus**

Stadium														Rezidiv
T-Stadium					Grading			Immunscore						
Ta	T1	T2	T3	T4	G1	G2	G3	0	1	2	3	4		
Kein LOH (n = 46)														
19	14	7	6	0	5	18	23	7	13	7	1	4	9	
LOH in mindestens einem Locus (n = 68)														
25	20	15	7	1	4	23	41	36	10	5	0	1	13	

n= Anzahl der Proben mit und ohne LOH

Für LOH unabhängig vom Locus und dem Immunscore konnte eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden ( $p=0,0067$ ). Im Vergleich zum T-Stadium, Grading oder Auftreten eines Rezidivs lagen keine statistisch signifikanten Ergebnisse vor (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus LOH**

	Immunscore		T-Stadium		Grading		Rezidiv	
	0-1	2-4	Ta-T1	T2-4	G1-2	G3	Ja	Nein
<b>LOH</b>	46	20	45	33	27	23	13	9
<b>Kein LOH</b>	6	12	23	13	41	23	55	36
<b>p-Wert</b>	<b>0,0067</b>		0,6818		0,3372		1,000	

### 3.3.4 Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus im Intron 8

Da sich drei der Mikrosatellitenloci im Intron 8 befinden, wurden die Ergebnisse unter dem Aspekt zusammengestellt, ob ein Heterozygotieverlust in mindestens einem der Marker hier eine statistisch signifikante Auswirkung hat. Die Gegenüberstellung des Immunscores von Locus-unabhängigem LOH auf Intron 8 zum Immunscore der Fälle ohne LOH zeigte mit  $p=0,0024$  eine statistisch signifikante Korrelation (siehe Tabelle 20).

**Tabelle 20: Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus in Intron 8**

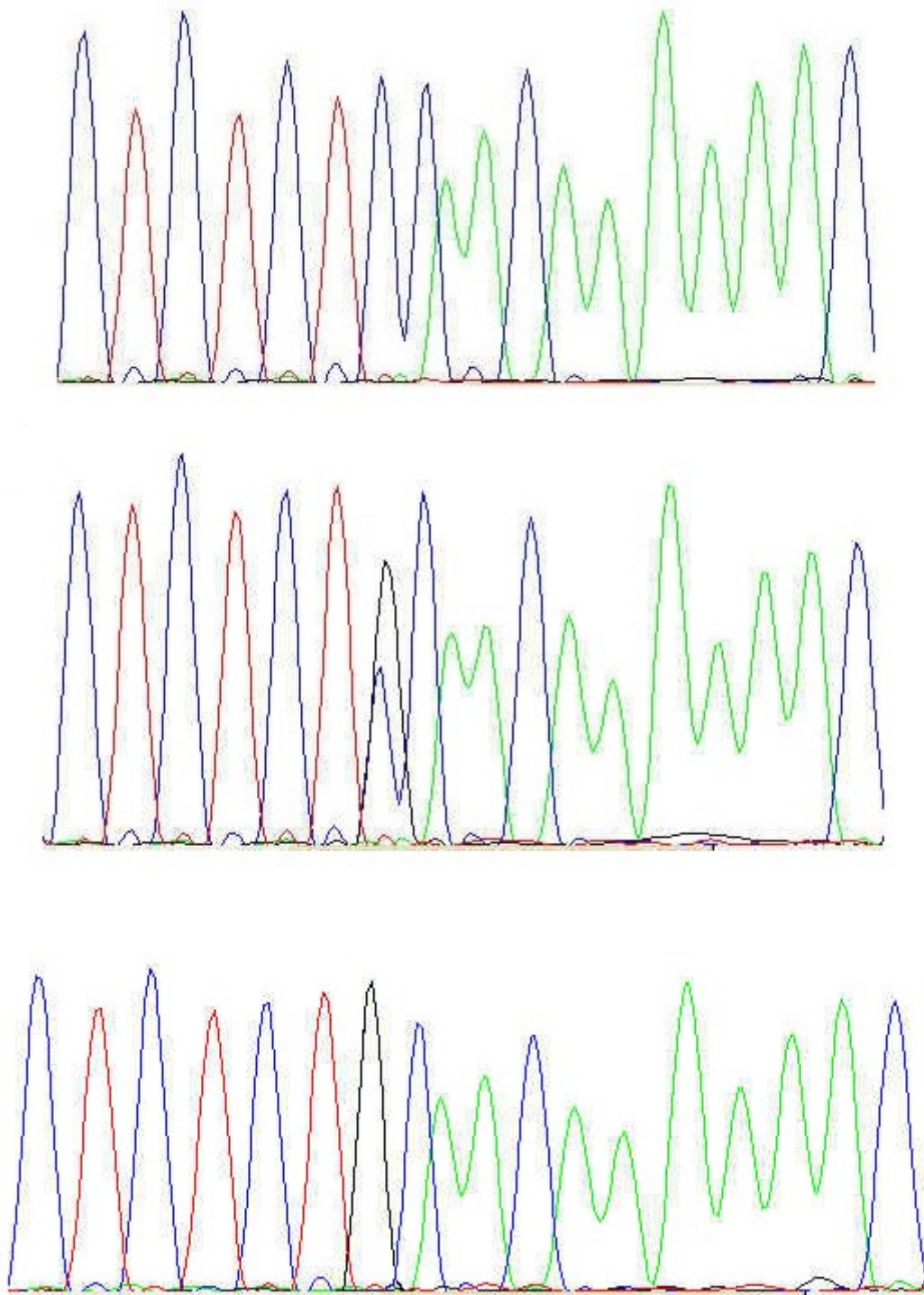
	LOH in Intron 8	LOH in Exon 1	Kein LOH
Immunscore			
0-1	<b>85</b>	33	20
2-4	<b>11</b>	2	12
<b>p-Wert</b>	0,5120		<b>0,0024</b>

### **3.4 Mutationsscreening in den Exons des *WWOX* Gens**

Insgesamt wurden alle zehn Exons des *WWOX* Gens in 114 Tumorproben untersucht. Es wurden weit über 1.140 PCRs sowie ebenso viele Sequenzier-PCRs und eine große Anzahl an Reamplifikationen durchgeführt. Trotz der Größe der Stichprobe konnten keine Mutationen nachgewiesen werden, sämtliche gefundenen Veränderungen waren bekannte Varianten und konnten im gesunden Gewebe des Patienten bestätigt werden (siehe Kapitel 3.5).

### **3.5 Analyse der bei den Patienten dieser Studie aufgetretenen Varianten und Vergleich mit publizierten europäischen Daten**

In der in dieser Studie mit Hilfe der Sequenzierung analysierten Region des *WWOX* Gens befinden sich laut NCBI (National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) 76 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). In vier dieser Varianten konnte im Patientenkollektiv der Studie neben dem Wildtyp-Allel auch das seltenere Allel nachgewiesen werden. Jede dieser Veränderungen gegenüber dem Wildtyp wurde durch eine Wiederholungsanalyse bestätigt. Grundsätzlich fanden sich in den Tumorproben und im gesunden Gewebe ein und desselben Patienten keine Unterschiede in den Genotypen. Anschließend wurden die Genotyp- und Allelfrequenzen mit den publizierten Daten einer europäischen Population verglichen (siehe Tabelle 21). Für die Allel- und Genotypverteilung von rs67493355 (vor Exon 2), rs144601717 (in Exon 4), rs11545029 (in Exon 6) und rs7201683 (in Exon 7) zeigten sich keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den publizierten Daten der europäischen Population und den Patienten dieser Studie. Dagegen zeigte sich bei vier Harnblasenkarzinompatienten im SNP rs3764340 (Exon 8) der homozygote Genotyp GG (siehe Abbildung 6), der in der gesunden europäischen Normalbevölkerung überhaupt nicht auftaucht. Auch der heterozygote Genotyp CG und das Allel G insgesamt konnten bei diesen vier Patienten deutlich häufiger nachgewiesen werden als in der gesunden Vergleichsbevölkerung (siehe Tabelle 21).



**Abbildung 6: Variante in Exon 8 – oben Wildtyp (Proben-Nr. 27), Mitte heterozygot (Proben-Nr. 106), unten homozygot variantes Allel (Proben-Nr. 25); Sequenz: CTCTCTCAACAAAAAC (C→G).**

**Tabelle 21 Genotypen- und Allelfrequenzen von Patienten (europäisch) und Europäern für die einzelnen SNPs**

	Genotypfrequenzen			Allelfrequenzen	
	GG	GT	TT	G	T
rs67493355 vor Exon 2					
Europäer (n=1267)	0,459	0,442	0,099	0,68	0,32
Patienten (europäisch)	0,465	0,377	0,158	0,65	0,35
rs144601717 in Exon 4	CC	CT	TT	C	T
Europäer (n=1321)	0,959	0,041	-	0,98	0,02
Patienten (europäisch)	0,982	0,018	-	0,99	0,01
rs11545029 in Exon 6	AA	GA	GG	A	G
Europäer (n=226)	0,363	0,460	0,177	0,59	0,41
Patienten (europäisch)	0,579	0,175	0,246	0,67	0,33
rs7201683 in Exon7	CC	CG	GG	C	G
Europäer (n=226)	0,965	0,035	-	0,98	0,02
Patienten (europäisch)	0,982	0,018	-	0,99	0,01
rs3764340 in Exon 8	CC	CG	GG	C	G
Europäer (n=226)	0,912	0,088	-	0,96	0,04
Patienten (europäisch)	0,781	0,184	<b>0,035</b>	0,87	0,13

n=Anzahl der Patientenproben

### 3.5.1 Statistische Auswertung für rs3764340 in Exon 8

Für das häufigere Auftreten des G-Allels von rs3764340 bei Harnblasenkarzinompatienten konnte eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ( $p < 0,0002$ ) (siehe Tabelle 22). Darüber hinaus trat auch der Genotyp GG in diesem SNP signifikant häufiger bei den Patientenproben dieser Studie auf als in den publizierten europäischen Daten ( $p = 0,0122$ ).

**Tabelle 22: Korrelationen der Genotypen- und Allelverteilung von rs3764340 für gesunde Europäer mit an Harnblasenkarzinomen erkrankten Europäern**

	Patienten (europäisch)	Gesunde Europäer
Genotypenverteilung		
GG	4	0
CC und CG	110	226
p-Wert	0,0122	
GG und CG	25	20
CC	89	206
p-Wert	0,0012	
Allelverteilung		
G	29	20
C	199	432
p-Wert	<0,0002	

Auch in Bezug auf die weiteren untersuchten Parameter (T-Stadium, Grading, Rezidive) konnten statistisch signifikante Korrelationen nachgewiesen werden zwischen einer Rezidivierung und dem Auftreten des G-Allels ( $p < 0,0001$ ) und dem Auftreten des GG-Genotyps ( $p = 0,0255$ ). Sowohl das seltenere Allel als auch der homozygote GG-Genotyp fanden sich auffällig häufiger bei Patientenproben, bei denen der Tumor rezidiert war, als bei den anderen Patientenproben (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23: Korrelationen der Genotypen- und Allelverteilung für rs3764340 in Bezug auf Rezidive**

	Rezidiv	Kein Rezidiv
Genotypenverteilung		
GG	3	1
CC und CG	20	90
p-Wert	0,0255	
GG und CG		
GG und CG	12	13
CC	11	78
p-Wert	<0,0003	
Allelverteilung		
G	15	14
C	31	168
p-Wert	<0,0001	

## 4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, molekulargenetische Mechanismen, die an der Entstehung von Urothelkarzinomen beteiligt sein könnten, besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Studie ist es gelungen, bei Urothelkarzinomen eine verminderte Immunexpression sowie LOH von *WWOX*, einem bekannten Tumorsuppressorgen, nachzuweisen. Des Weiteren trat das seltenere Allel der Variante rs3764340 im *WWOX* Gen signifikant häufiger bei Patienten mit Urothelkarzinomen auf als in der gesunden Bevölkerung. Mutationen des *WWOX* Gens konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Leitfrage der folgenden Diskussion ist daher, welche Bedeutung die Ergebnisse haben, wie diese in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext einzuordnen sind und warum die Identifizierung von Mutationen mit den gewählten Methoden nicht gelang.

### 4.1 Methodik

Die Entstehung von Krebs ist ein komplexer Mehrstufenprozess, der sich aus Veränderungen der Zelle und ihren physiologischen Kontrollmechanismen für Proliferation, Teilung und Apoptose zusammensetzt. Diese Veränderungen werden durch Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgen verursacht (Weinberg, 2014). Für eine vollständige Inaktivierung von Tumorsuppressorgen (TSGs) müssen beide Allele des Gens verändert sein. Die Inaktivierung des einen Allels kann durch Mutationen oder epigenetische Veränderungen erfolgen und die des zweiten in Form von Deletionen, die mittels Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity - LOH) nachgewiesen werden können. TSGs, die die Zellproliferation regulieren, werden als Gatekeeper bezeichnet. Ihre Inaktivierung erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Transformation in eine maligne Zelle und kann ein Grundstein in der Krebsentstehung sein. Vermehrtes Auftreten von LOH an einem bestimmten Chromosomenabschnitt gilt daher als Hinweis für ein TSG (Weinberg, 2014), entsprechend wird für das in dieser Studie untersuchte *WWOX* Gen eine Funktion als TSG vermutet, da sich LOH von *WWOX* für unterschiedliche Karzinomformen fand (Chen et al., 1996; Paige et al., 2001).

Eine wesentliche Aussagekraft über die Funktion eines TSGs bietet die Untersuchung der korrespondierenden Proteinexpression. Hierzu werden immunhistochemische Methoden eingesetzt, die mittels Antigen-Antikörperreaktion an einem bestimmten Epitop die



Expressionsstärke eines Proteins nachweisen. Die Standardisierung der Methode und die richtige Auswahl von positiven Kontrollen sind von großer Bedeutung, weil jede Epitop-Antikörper-Kombination unterschiedlich empfindlich reagiert. Da die Immunreaktion subjektiv beurteilt wird, sind Ergebnisse verschiedener Labore schwer zu vergleichen (Lang, 2013). Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass je nach ausgewähltem Epitop nicht nur das ursprüngliche Protein, sondern durch Genmutationen auch veränderte Proteine gleichermaßen detektiert werden.

Deletionen eines TSGs können in Form von Copy Number Variations (CNVs) und allelischen Imbalancen auftreten. Bei der Analyse der CNV werden die Genome von Individuen verglichen, während allelische Imbalancen Unterschiede in der Ausprägung von Mikrosatellitenmarkern in der Region des Gens auf den beiden Chromosomen eines Individuums beschreiben. Eine besondere Form der allelischen Imbalance ist der Heterozygotieverlust (LOH). Um LOH nachzuweisen, nutzt man polymorphe DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten), deren chromosomale Lokalisation bekannt ist. Die Ausprägung der Mikrosatelliten im Tumorgewebe wird bei dieser Analyse mit der im gesunden Gewebe verglichen. Liegt ein Gen in heterozygoter Ausprägung vor, zeigen sich unterschiedliche Längenpolymorphismen und es entstehen zwei unterschiedlich große PCR-Produkte. Ist der Mikrosatellit auf beiden Chromosomen identisch ausgeprägt (homozygot), entstehen entsprechend nur PCR-Produkte einer Länge. Im zweiten Fall kann kein Verlust beurteilt und keine Aussage über LOH getroffen werden, diese Proben werden als nicht informativ (n.i.) bezeichnet (Dutt et al., 2007; Strachan et al., 2005; Wagener et al., 2010). Zeigt sich in der Analyse der Tumor-DNA nur eines der beiden Allele, die in der DNA aus dem gesunden Gewebe gefunden wurden, bzw. ist das zweite Allel um mindestens die Hälfte kleiner als im gesunden Gewebe, handelt sich um einen Heterozygotieverlust (LOH). Bei der Beurteilung der LOH-Analyse müssen folgende Probleme bedacht werden. Es gilt, den stochastischen Effekt bei der Amplifikation ungleicher Mengen heterozygoter Allele zu berücksichtigen. Zu geringe Mengen von DNA können dazu führen, dass ein oder beide Allele nicht detektiert werden. Wird eines der beiden Allele im gesunden Gewebe nicht detektiert, führt dies zu der Detektion eines vermeintlich homozygoten Allels und folglich zu einem nicht informativen Fall (Walsh et al., 1992). Dasselbe Phänomen führt im Tumorgewebe zu der fälschlichen Annahme von LOH. Außerdem kann LOH durch unterschiedliche Mechanismen zustande kommen wie z.B. dem Verlust eines ganzen Chromosoms durch Non-Disjunktion oder Verlust eines Chromosoms mit Reduplikation des verbliebenen Chromosoms in der Mitose,

mitotische Rekombinationen oder Deletionen, teilweise verursacht durch die für Tumorzellen typischen mangelnden Reparaturmechanismen während der DNA-Synthese (Cavenee et al., 1983).

Neben Heterozygotieverlusten sind Punktmutationen wichtige in Tumoren auftretende Aberrationen. Ein Screening nach unbekannten Mutationen lässt sich am besten mit Hilfe der Sequenzierung des gesamten Gens oder einzelner Exons durchführen. Hierbei muss bedacht werden, dass im Tumorgewebe neben mutierten Zellen auch gesunde Zellen und Entzündungszellen vorhanden sind, in denen die Tumor-spezifischen Mutationen nicht nachweisbar sind. Entsprechend kann sich eine Punktmutation in Form einer Überlagerung zweier Basen (Wildtyp und Mutation), als Überlagerung zweier unterschiedlich gefärbter Peaks darstellen. Der Anteil der mutierten DNA sollte mindestens bei 15-25% der Gesamt-DNA liegen, um einen sicheren Nachweis der Punktmutationen gewährleisten zu können (Lang, 2013). Neben somatischen, den neu im Tumorgewebe auftretenden Mutationen, lässt sich mit Hilfe der Sequenzierung die allelische Ausprägung von bekannten Varianten bestimmen, sofern diese sich im sequenzierten Bereich der DNA befinden.

#### **4.2 Genetische Aberrationen bei Harnblasenkarzinomen**

Da die molekularen Grundlagen des Harnblasenkarzinoms nicht vollständig geklärt sind, existieren derzeit unterschiedliche Vorstellungen darüber. So konnte LOH von Chromosom 9 oft in papillären Ta-Tumoren nachgewiesen werden. LOH von Chromosom 17p, der Region des Tumorsuppressorgens *p53*, zeigte sich hingegen vermehrt in Tumoren III. und IV Grades. Manche Veränderungen bedingen sich gegenseitig, wie der homozygote Verlust des Tumorsuppressors *p16* auf Chromosom 9p21 und Deletionen des Retinoblastom-Gens auf Chromosom 13. Die reziproke Verbindung der Veränderungen der beiden Gene zeigt ihre entscheidende Rolle für den Weg der Harnblasenkarzinomentwicklung (Sánchez-Carbayo, 2012).

Neben den klassischen Veränderungen der DNA oder von Proteinen spielt die Erforschung epigenetischer Veränderungen eine immer größere Rolle in der Tumorforschung. Es wurden bei Harnblasenkarzinomen die Methylierungsmuster und die Expression der beiden common Fragile Sites *FHIT* und *WWOX* untersucht. Für beide cFS konnten Hypermethylierungen einhergehend mit verminderter *WWOX*/*FHIT* Proteinexpression nachgewiesen werden (Iliopoulos et al., 2005).

#### 4.2.1 Expression des *WWOX* Gens

Diverse Studien untersuchten die WWOX Expression bei Urothelkarzinomen und stellten je nach Studie statistisch signifikante Korrelationen zwischen verminderter WWOX Expression und verschiedensten Parametern her. In einer Studie zeigte sich die WWOX Proteinexpression von Urothelkarzinomen in über 40% (3/7) der Fälle stark reduziert, wohingegen das nicht neoplastische Kontrollgewebe hohe WWOX Expression zeigte (Iliopoulos et al., 2005).

Ramos et al. (2008) fanden für das Grading ( $p < 0.001$ ), das T-Stadium ( $p = 0.002$ ), die Tumorgroße ( $p = 0.04$ ) sowie die Karzinomprogression (Anstieg des Tumorstadiums oder Metastasierung;  $p = 0.028$ ) in 101 primären Urothelkarzinomen Korrelationen zu verminderter WWOX Expression, außerdem zeigte der Verlust der WWOX Expression in der Kaplan-Meier-Analyse eine signifikante Korrelation mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben ( $p = 0.042$ ). Die Autoren schlossen hieraus, dass WWOX ein potentieller prädiktiver Marker für aggressivere Stadien der Urothelkarzinome sein könnte.

Yang et al. (2012) wiesen in 79,5% der untersuchten Urothelkarzinome (Untersuchungsumfang 78 Tumore) eine verminderte WWOX Expression nach. Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen histopathologischem Grading (G1-G3) und der WWOX Expression hergestellt werden ( $p = 0,019$ ).

Im Rahmen dieser Studie konnte keine dieser Korrelationen bestätigt werden, möglicherweise dadurch begründet, dass die Hälfte der analysierbaren Tumore dieser Studie überhaupt keine Expression von WWOX aufwies und in keiner der Proben eine hohe WWOX-Expression nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus sind in allen drei Studien deutlich unter 200 Patienten untersucht worden. Diese eher geringe Anzahl kann zu deutlichen Abweichungen in den Ergebnissen der einzelnen Studien führen.

Im Gegensatz zu der Publikation von Ramos et al. (2008) zeigte die Mehrheit der Harnblasenkarzinome in dieser Studie keine oder nur eine schwache immunhistochemische WWOX-Expression. Eine stärkere Immunreaktion war selten und konnte nur fleckförmig in den betreffenden Fällen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie ein modifizierter Score zur Auswertung verwendet und nicht der von Ramos et al. (2008) empfohlene Multiplikator-Score. Des Weiteren können die gegenüber den publizierten Daten abweichenden immunhistochemischen Ergebnisse dieser Studie bedingt sein durch den Gebrauch unterschiedlicher Antikörper oder verschiedener präanalytischer Bedingungen, wie z.B. Zeit für die Fixierung des Gewebes oder Gestaltung des Protokolls für die anschließende

Weiterverarbeitung des Gewebes. Ferner fand sich in mehreren Fällen eine Kernfärbung. Diese Translokation der WWOX-Immunfärbung wurde bereits von Watanabe et al. (2003) bei Epithelzellen der Mamma beschrieben. Darüberhinaus zeigte sich ein Fall mit ungewöhnlicher perinukleärer Immunfärbung (Abbildung 3). Das Auftreten unterschiedlicher Muster und Intensitäten der WWOX-Immunfärbung bei Brustkrebszellen wurde von Eremo et al. (2013) publiziert. Dementsprechend schien es gerechtfertigt, eine Kernfärbung als positives Ergebnis zu akzeptieren.

Neben Urothelkarzinomen wurden auch schon viele andere Karzinomformen auf ihre WWOX Expression und Korrelationen mit verschiedenen Parametern (T-Stadium, Grading, Alter, Geschlecht) untersucht. Es zeigten sich heterogene Ergebnisse, auch wenn in den meisten analysierten Tumorentitäten eine Reduktion der WWOX-Expression auftrat. Qin et al. (2006) wiesen bei 84% der untersuchten Prostatakarzinome eine Reduzierung der WWOX mRNA-Expression nach. Aqeilan et al. (2004) konnten für 65% (36/81) der untersuchten Adenokarzinome des Magens keine WWOX Proteinexpression nachweisen, eine statistisch signifikante Korrelation zeigte sich zwischen WWOX Expression und histopathologischem Grading (G1-3) ( $p=0,02$ ). Bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen (ECC) hatten 53,33% (16/30) nicht detektierbare WWOX Expressionslevel und es zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Expression und Grading ( $p=0,002$ ). Keinerlei Korrelationen lagen für klinisch-pathologische Faktoren (Alter, Geschlecht, Staging) vor (Wang et al., 2008). Bloomston et al. (2009) untersuchten die WWOX Expression von 98 Pankreas-, 49 Papillen- und 23 Gallenblasenkarzinomen. Der Verlust der WWOX Expression korrelierte nicht mit der Karzinomprogression oder dem Patientenüberleben. Die Autoren stellten die Theorie auf, dass der Verlust der WWOX Expression mit der Lage von *WWOX* auf dem common Fragile Site (cFS) *FRA16D* zusammenhinge. cFS reagieren aufgrund ihrer enormen Größe sensibel auf Replikationsstress (Helmrich et al., 2011). Bloomston et al. (2009) nahmen daher an, dass die Genexpression und cFS Instabilität sich bedingen und auf ein frühes Ereignis in der Pathogenese von Gallenblasen-, Pankreas- und Papillenkarzinomen hindeuten könnte.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass die WWOX Expression sowohl beim Urothelkarzinom als auch in vielen weiteren Karzinomformen vermindert bis nicht mehr vorhanden ist, sodass der Verlust der WWOX Proteinexpression in der Karzinogenese eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Lagen statistisch signifikante Korrelationen zwischen der Expression des *WWOX* Gens und bestimmten Tumoreigenschaften vor, zeigten sich diese

in den betrachteten Studien vor allem bei verminderter *WWOX* Expression und höhergradigen Tumoren. Dies würde die von Ramos et al. (2008) aufgestellte These von *WWOX* als potentiell prädictiven Marker für aggressivere Tumorstadien unterstützen.

#### 4.2.2 Heterozygotieverluste in Mikrosatellitenmarkern in den Introns des *WWOX* Gens

Heterozygotieverluste in Mikrosatelliten, die sich in der Nähe oder in den Introns des *WWOX*-Gens befinden, wurden für diverse Tumoren beschrieben (Cheng et al., 2012; Guo et al., 2013a; Guo et al., 2013b; Härkönen et al., 2005; Kluth et al., 2015; Pluciennik et al., 2014; Wang et al., 2008). In Urothelkarzinomen von 32 polnischen Patienten mit einem hohen Anteil an G1-Ta Tumoren untersuchten Pluciennik et al. (2014) die Mikrosatellitenmarker D16S518 und D16S3096 auf Heterozygotieverlust. Im Locus D16S518 (Intron 1) zeigten sich in 64,5% und im Locus D16S3096 (Intron 8) in 25,8% der Fälle LOH, die Autoren konnten allerdings keinerlei Korrelationen zwischen LOH und den Parametern *WWOX* Proteinexpression, Grading, T-Stadium, Alter oder Geschlecht nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Studie wiesen mit LOH für D16S518 in 44,57% (41/92) und für D16S3096 in 39,8% (39/98) der Fälle eine vergleichbare Verteilung zu der von Pluciennik et al. (2014) auf, aber es fanden sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen der Proteinexpression und LOH in einzelnen Loci.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt die unterschiedlich große Stichprobenzahl (32 zu 114) beider Studien als wesentlicher Faktor und mögliche Erklärung für die dargestellten Unterschiede in statistischen Korrelationen auf. Weiterhin zeigte sich beim Grading der Urothelkarzinome eine inverse Verteilung, mit 57% G1-Urothelkarzinomen bei Pluciennik et al. (2014) zu 57% G3-Urothelkarzinomen unserer Studie. Bei der Verteilung der T-Stadien waren die von Pluciennik et al. (2014) untersuchten Urothelkarzinome zu 70% in der Gruppe der nichtinvasiven Ta-Karzinome zu finden im Vergleich zu 38,6% beim Kollektiv dieser Studie. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass LOH von *WWOX* und damit einhergehende verminderte *WWOX* Expression Merkmale invasiver und höhergradiger Urothelkarzinome sein könnten. Der Anteil an Heterozygotieverlusten des langen Arms von Chromosom 16 bei anderen Karzinomformen wies eine sehr hohe Schwankung auf. Ebenso zeigten die Korrelationen für LOH mit den untersuchten Parametern sehr heterogene Ergebnisse. Es handelte sich vorwiegend um Korrelationen mit dem T-Stadium, dem Grading

oder der *WWOX* Expression. Weitere Korrelationen waren sowohl sehr karzinom- als auch parameterspezifisch, somit kaum vergleichbar und schwer zu bewerten.

Bei Prostatakarzinomen US-amerikanischer Männer fand sich LOH in 17,7% (11/62) der Fälle, in Korrelation mit einem höheren T-Stadium ( $p>0,047$ ) (Cheng et al., 2012). Härkönen et al. wiesen bei finnischen Patienten LOH in 68% (21/31) der primären Prostatakarzinome und 90% (28/31) der Rezidive nach (2005). Unter den Rezidiven wies der Mikrosatellitenlocus D16S520 statistische Signifikanz für LOH ( $p<0,01$ ) auf. Kluth et al. (2015) wiesen in 21% (814/3.831) heterozygote Deletionen von 16q der untersuchten Prostatakarzinome nach. Die Deletionen korrelierten stark mit fortgeschrittenem T-Stadium, hohem Gleason Score (Äquivalent des Gratings, speziell beim Prostatakarzinom), beschleunigter Zellvermehrung, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sowie Anstieg des biochemischen Markers PSA (Prostata-spezifischen Antigen) ( $p<0,0001$  alle) und einem positiven Tumorresektionsrand ( $p<0,0004$ ). Für extrahepatische Cholangiokarzinome chinesischer Patienten zeigte sich in 50% (15/30) der Fälle LOH, das – ebenso wie die verminderte *WWOX* Proteinexpression – mit dem Grading korrelierte ( $p<0,0001$ ;  $p=0,002$ ) (Wang et al., 2008).

Guo et al. fanden LOH von *WWOX* bei Adenokarzinomen des Magens und bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (2013a, b), jeweils signifikant assoziiert mit einer verminderten Immunexpression. Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus lag LOH in 41,4% (53/128) der Karzinome vor (Guo et al., 2013b). Es bestanden statistisch signifikante Korrelationen zwischen verminderter *WWOX* Expression mit LOH ( $p=0,024$ ), Methylierungen im Promotorbereich ( $p=0,014$ ) und im Exon 1 ( $p=0,019$ ) sowie mit Karzinomen in höherem T-Stadium ( $p=0,032$ ). Guo et al. (2013b) schlossen auf verschiedene Mechanismen in Form von LOH oder Methylierungen in der Karzinogenese von Adenokarzinomen des Magens und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass der Heterozygotieverlust von Chromosom 16, auf dem sich das *WWOX* Gen befindet, neben Urothelkarzinomen in vielen weiteren Karzinomformen auftritt. Die im Rahmen dieser Studie gefundene Korrelation für LOH von *WWOX* und damit einhergehende verminderte *WWOX* Immunexpression bei Urothelkarzinomen konnte für Urothelkarzinome in keiner vergleichbaren Studie nachgewiesen werden, für andere Karzinomformen allerdings schon.

#### 4.2.3 Mutationen des *WWOX* Gens

Somatische Mutationen im Tumorgewebe sind einer der Mechanismen in dem Mehrstufenprozess der Krebsentstehung. Bei den Tumorsuppressorgenen, zu denen das *WWOX* Gen zählt, wird vermutet, dass beide Allele des betroffenen Gens mutiert sein müssen, um die Krebsentstehung zu beeinflussen. Bislang wurden kaum Mutationen für *WWOX* nachgewiesen. Schon Bednarek et al. beschrieben keine einzige Mutation von *WWOX* in den von ihnen untersuchten Mammakarzinomen (Bednarek et al., 2000). Eine einzige Missense-Mutation in Verbindung mit LOH beschrieben Kuroki et al. (2002) bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Die genaue Auswirkung dieser Mutation ist nicht bekannt. Aldaz et al. (2014) entdeckten 44 neue somatische Mutationen des *WWOX* Gens für verschiedene Karzinomformen, unter anderem auch eine bei Harnblasenkarzinomen. Die höchsten Mutationsraten zeigten sich für Kopf-Hals-Karzinome sowie Adenokarzinome des Uterus und des Magens. Insgesamt betrafen 59% (26/44) aller gefundenen *WWOX* Mutationen die Proteinfunktion. Dazu zählten fünf Nonsense-, drei Frameshift-Mutationen sowie 18 Missense-Mutationen.

Keine der bisher beschriebenen Mutationen und auch keine unbekannte Mutation konnte in dieser Studie gefunden werden.

Eine mögliche Erklärung ist die Lage von *WWOX* innerhalb des common Fragile Site *FRA16D*. Diese Lage ist möglicherweise Grund für das vermehrte Auftreten von LOH und homozygoten Deletionen im Bereich von *WWOX* bei Karzinomen. Da cFS sehr groß sind, sind sie anfälliger für Chromosomenbrüche während der Replikation, so dass häufiger LOH und homozygote Deletionen entstehen, jedoch kaum Punktmutationen (Schrock et al., 2015).

#### 4.2.4 Polymorphismen des *WWOX* Gens

Nicht nur Mutationen sondern auch Polymorphismen spielen eine Rolle in der Entstehung diverser (Tumor) Erkrankungen. Der Austausch einer Aminosäure, ein sogenannter Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) kann eine Erkrankung bis hin zum Tumor verursachen.

Der bekannteste Polymorphismus im Zusammenhang mit Harnblasenkarzinomen ist der der N-Acetyltransferase 2 (NAT2), die an der Verstoffwechselung der aromatischen Amine beteiligt ist. Es existieren jedoch kontroverse Studienergebnisse, inwiefern die Variante der

NAT2 in Form der Langsam-Acetylierer an der Entstehung von Harnblasenkarzinomen beteiligt ist (Schwender et al., 2012).

Eine Vielzahl an SNPs wurde in den letzten Jahren mit Harnblasenkarzinomen in Verbindung gebracht. Für SNPs nahe der Gene *MYC*, *TP63* (transformation-related protein 63), *PSCA* (prostate stem cell antigen), *TERT* (telomerase reverse transcriptase) und *FGFR3* wurden Assoziationen mit Harnblasenkarzinomen nachgewiesen (Golka et al., 2011). Der entscheidende Faktor für das Risiko, Harnblasenkarzinome zu entwickeln, scheint nicht ein einziger SNP zu sein, sondern vielmehr die Summe der SNPs.

Ein weiterer entscheidender Einflussfaktor scheint die untersuchte Population zu sein. Khan et al. (2015) fanden in ihrer Metaanalyse für den Polymorphismus Arg72Pro des Tumorsuppressors p53 bei Asiaten und Amerikanern ein erhöhtes Risiko, Karzinome zu entwickeln.

Die in dieser Studie gefundenen Varianten von *WWOX* traten sowohl in unterschiedlichen Populationen als auch für die verschiedensten Karzinomformen auf.

Paige et al. (2001) fanden vier mit Karzinomen assoziierte Missense-Polymorphismen sowie eine Vielzahl an weiteren Varianten innerhalb des *WWOX* Gens in verschiedenen Zelllinien unterschiedlichster Karzinome. Eine der am häufigsten untersuchten Varianten ist der SNP rs3764340 im Exon 8, der zu einem Aminosäureaustausch Prolin zu Alanin resultiert. Hier konnte für mehrere Arten solider Tumore eine signifikante Assoziation des varianten G-Allels mit dem Auftreten von Tumoren nachgewiesen werden (Cancemi et al., 2011; Guo et al., 2013a; Guo et al., 2013b; Zhang et al., 2016).

Cancemi et al. (2011) konnten in einer Untersuchung von 1.741 italienischen Patienten die Assoziation des G-Allels im SNP rs3764340 zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines differenzierten Schilddrüsenkarzinoms ausmachen. Auch Guo et al. (2013a) wiesen eine höhere Adenokarzinomrate der Magenkarzinome für die Genotypen CG/GG gegenüber CC bei nordchinesischen Patienten nach. Außerdem traten die CG- und GG-Genotypen häufiger bei Patienten mit höheren T-Stadien auf. Ähnliche Ergebnisse wiesen Guo et al. (2013b) auch für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus nach. In der Analyse einer Studie mit 482 nordchinesischen Patienten ging das G-Allel mit einem signifikant erhöhten Risiko der Tumorentstehung einher ( $p=0,008$ ). Für die Genotypen CG und GG wiesen sie eine statistisch signifikante Korrelation mit höheren T-Stadien ( $p=0,014$ ) nach (Guo et al., 2013b). Laut einer Studie von Zhang et al. (2016) mit 276 ostchinesischen Osteosarkompatienten geht der CG Genotyp ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für diesen Tumortyp einher.



Die hier vorgestellte Studie zeigte vergleichbare Ergebnisse, da sowohl das seltenere G-Allel als auch der homozygote GG-Genotyp des SNPs rs3764340 mit einem Risiko für Urothelkarzinome und deren Rezidivneigung korrelierte. Die mögliche Relevanz des varianten Allels dieses SNPs wird durch die sehr ähnlichen Ergebnisse bei der Untersuchung unterschiedlicher Karzinomtypen und unterschiedlicher Ethnien noch unterstrichen. Die physiologische Auswirkung des Aminosäureaustausches von Prolin zu Alanin ist noch nicht vollständig untersucht. Cancemi et al. (2011) wiesen die Konservierung von Prolin auf dem Codon-282 auch in phylogenetisch fernen Organismen (*Drosophila*) nach und schlossen auf signifikante Auswirkung dieser Veränderung auf die Proteinstruktur von WWOX.

### 4.3 Ausblick

Die hier beschriebenen Veränderungen von *WWOX* in Form von verminderter Expression, LOH und dem verstärkten Auftreten des varianten Allels des SNP rs3764340 bei Urothelkarzinomen sollten durch weitere Studien belegt werden. Ein Kritikpunkt ist, dass in dieser Studie nicht der Methylierungszustand in Zusammenschau mit der Immunexpression von *WWOX* untersucht wurde. Dies sollte ebenfalls Gegenstand weiterer Studien sein. Die Determinante *Rauchen* spielte in unserer Studie keine Rolle, da die Stichprobe zu wenige Raucher enthielt. Gerade im Hinblick auf epigenetische Veränderungen sollte dieser Faktor in weiteren Studien untersucht werden, da Korrelationen zwischen Hypermethylierungen von *WWOX* bei Urothelkarzinomen und dem Rauchen gefunden wurden (Yang et al., 2012).

Weiterhin gilt es, die Rolle des cFS *FRA16D*, auf dem *WWOX* liegt, für Urothelkarzinome und weitere Karzinomformen zu klären. Für *FRA16D* zeigte sich bei Rauchern zwar die höchste Expression von FRA16D, aber auch eine Zunahme an Chromosomenbrüchen und -lücken (Stein et al., 2002).

Mittelfristig sollten die unterschiedlichen molekularen Veränderungen von Urothelkarzinomen untersucht werden, um die heterogene Gruppe der T1-Tumore weiter differenzieren zu können.

Somit könnten auf lange Sicht die für die Patienten besten Therapieoptionen gewählt und die Prognosen für das Urothelkarzinom verbessert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung und Entwicklung von Urothelkarzinomen lassen sich nicht nur auf eine genetische Veränderung reduzieren, vielmehr zeigen sich für die unterschiedlichen Schweregrade verschiedenste molekulare Veränderungen, die entscheidend für die Therapie, Überwachung sowie die Prognose des Patienten sind. Aberrationen des WW domain containing oxireductase (*WWOX*) Gens, die bei vielen anderen Karzinomformen eine Rolle spielen, wurden auch als wichtiger Faktor in der Entstehung/Progression von Urothelkarzinomen vorgeschlagen. In dieser Studie wurde mittels Immunhistochemie die Expression des Tumorsuppressorgens *WWOX* in 84 Proben von Urothelkarzinomen untersucht, sowie eine Heterozygotieanalyse der vier Mikrosatelliten Loci D16S3096, D16S3029, und D16S504 (alle im Intron 8) und D16S518 im Intron 1 in 114 Proben von Urothelkarzinomen durchgeführt. Ein Mutationsscreening in den Exons 1 bis 9 und den entsprechenden Intron-Exon-Boundaries erfolgte mittels Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die insgesamt stark verminderte *WWOX*-Expression (keine Expression in 51 % der Tumore) zeigte keine statistisch signifikanten Korrelationen mit den Differenzierungskriterien (T-Stadium, Grading, Rezidivierung). Heterozygotieverluste in mindestens einem der vier Mikrosatellitenloci konnten in 60 % der Urothelkarzinome nachgewiesen werden. Auch hier gab es keine statistisch relevanten Korrelationen mit den Differenzierungskriterien, dafür aber mit verminderter Proteinexpression ( $p=0,0067$ ). Somatische Mutationen im *WWOX* Gen konnten in den hier untersuchten Urothelkarzinomen nicht nachgewiesen werden. In den in dieser Studie sequenzierten Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Regionen sind insgesamt 76 Varianten beschrieben, allerdings konnte nur in vier von ihnen (rs67493355, rs144601717, rs11545029 und rs7201683) das aberrante Allel bestimmt werden. Statistisch signifikant häufiger fand sich das G-Allel des Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNPs) rs3764340 (Exon 8) sowohl bei Tumorpatienten insgesamt gesehen, als auch insbesondere bei den Patienten, die ein Rezidiv aufwiesen. Insgesamt konnte eine Beteiligung von Aberrationen im *WWOX* Gen bei Urothelkarzinomen nachgewiesen werden.

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aldaz, C. M., Ferguson, B. W., Abba, M. C. (2014). WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1846, 188-200.
2. Anderström, C., Johansson, S. L., von Schultz, L. (1983). Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic and prognostic study. *Cancer* 52, 1273-1280.
3. Aqeilan, R. I., Kuroki, T., Pekarsky, Y., Albagha, O., Trapasso, F., Baffa, R., Huebner, K., Edmonds, P., Croce, C. M. (2004). Loss of WWOX Expression in Gastric Carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 3053-3058.
4. Arai, T., Nakano, T., Fukuhisa, K., Kasamatsu, T., Tsunematsu, R., Masubuchi, K., Yamauchi, K., Hamada, T., Fukuda, T., Noguchi, H., Murata, M. (1991). Second cancer after radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cancer* 67, 398-405.
5. Arnold, C., Usadel, H., Blum, H. (2002). Epigenetics: significance for tumor genesis and clinical features. *Dtsch Med Wochenschr* 127, 1701.
6. Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Böhle, A., Palou-Redorta, J. (2008). EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* 54, 303-314.
7. Bednarek, A. K., Keck-Waggoner, C. L., Daniel, R. L., Laflin, K. J., Bergsagel, P. L., Kiguchi, K., Brenner, A. J., Aldaz, C. M. (2001). WWOX, the FRA16D Gene, Behaves as a Suppressor of Tumor Growth. *Cancer Res* 61, 8068-8073.
8. Bednarek, A. K., Laflin, K. J., Daniel, R. L., Liao, Q., Hawkins, K. A., Aldaz, C. M. (2000). WWOX, a Novel WW Domain-containing Protein Mapping to Human Chromosome 16q23.3-24.1, a Region Frequently Affected in Breast Cancer. *Cancer Res* 60, 2140-2145.

- 
9. Bedwani, R., Renganathan, E., El Kwahsky, F., Braga, C., Abu Seif, H. H., Abul Azm, T., Zaki, A., Franceschi, S., Boffetta, P., La Vecchia, C. (1998). Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *Br J Cancer* 77, 1186-1189.
10. Benedict, W. F., Lerner, S. P., Zhou, J., Shen, X., Tokunaga, H., Czerniak, B. (1999). Level of retinoblastoma protein expression correlates with p16 (MTS-1/INK4A/CDKN2) status in bladder cancer. *Oncogene* 18, 1197-1203.
11. Bloomston, M., Kneile, J., Butterfield, M., Dillhoff, M., Muscarella, P., Ellison, E. C., Melvin, W. S., Croce, C. M., Pichiorri, F., Huebner, K., Frankel, W. L. (2009). Coordinate Loss of Fragile Gene Expression in Pancreatobiliary Cancers: Correlations Among Markers and Clinical Features. *Ann Surg Oncol* 16, 2331-2338.
12. Bonser, G. M. (1943). Epithelial tumours of the bladder in dogs induced by pure  $\beta$ -naphthylamine. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 55, 1-6.
13. Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Chang-Claude, J., Bolm-Audorff, U., Jöckel, K.-H., Donato, F., Serra, C., Wahrendorf, J., Hours, M., T'Mannetje, A., Kogevinas, M., Boffetta, P. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86, 289-294.
14. Brock, N., Pohl, J., Stekar, J. (1981). Detoxification of urotoxic oxazaphosphorines by sulfhydryl compounds. *J Cancer Res Clin Oncol* 100, 311-320.
15. Butler, J. M. (2012): Advanced topics in forensic DNA typing : Methodology. San Diego: Elsevier.
16. Cancemi, L., Romei, C., Bertocchi, S., Tarrini, G., Spitaleri, I., Cipollini, M., Landi, D., Garritano, S., Pellegrini, G., Cristaudo, A., Pinchera, A., Barale, R., Elisei, R., Landi, S., Gemignani, F. (2011). Evidences that the polymorphism Pro-282-Ala within the tumor suppressor gene WWOX is a new risk factor for differentiated thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 129, 2816-2824.

- 
17. Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., White, R. L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305, 779-784.
18. Chang, J.-Y., He, R.-Y., Lin, H.-P., Hsu, L.-J., Lai, F.-J., Hong, Q., Chen, S.-J., Chang, N.-S. (2010). Signaling from membrane receptors to tumor suppressor WW domain-containing oxidoreductase. *Exp Biol Med* 235, 796-804.
19. Chen, T., Sahin, A., Aldaz, C. M. (1996). Deletion Map of Chromosome 16q in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast: Refining a Putative Tumor Suppressor Gene Region. *Cancer Res* 56, 5605-5609.
20. Cheng, I., Levin, A. M., Tai, Y. C., Plummer, S., Chen, G. K., Neslund-Dudas, C., Casey, G., Rybicki, B. A., Witte, J. S. (2012). Copy number alterations in prostate tumors and disease aggressiveness. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 66-76.
21. Coons, A. H., Leduc, E. H., Connolly, J. M. (1955). Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med* 102, 49-60.
22. Cordon-Cardo, C., Wartinger, D., Petrylak, D., Dalbagni, G., Fair, W. R., Fuks, Z., Reuter, V. E. (1992). Altered Expression of the Retinoblastoma Gene Product: Prognostic Indicator in Bladder Cancer. *J Natl Cancer Inst* 84, 1251-1256.
23. Cote, R. J., Dunn, M. D., Chatterjee, S. J., Stein, J. P., Shi, S.-R., Tran, Q.-C., Hu, S. X., Xu, H. J., Groshen, S., Taylor, C. R., Skinner, D. G., Benedict, W. F. (1998). Elevated and Absent pRb Expression Is Associated with Bladder Cancer Progression and Has Cooperative Effects with p53. *Cancer Res* 58, 1090-1094.
24. Cote, R. J., Esrig, D., Groshen, S., Jones, P. A., Skinner, D. G. (1997). p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 385, 123-124.
25. Cox, P. J. (1979). Cyclophosphamide cystitis—Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol* 28, 2045-2049.

26. Croce, C. M., Sozzi, G., Huebner, K. (1999). Role of FHIT in Human Cancer. *J Clin Oncol* 17, 1618.
27. Doneke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005): *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie* (15). Stuttgart: Thieme.
28. Dutt, A., Beroukhi, R. (2007). Single nucleotide polymorphism array analysis of cancer. *Curr Opin Oncol* 19, 43-49.
29. El-Bolkainy, M. N., Mokhtar, N. M., Ghoneim, M. A., Hussein, M. H. (1981). The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer* 48, 2643-2648.
30. Epstein, J. I., Amin, M. B., Reuter, V. R., Mostofi, F. K., Committee, B. C. C. (1998). The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *The American journal of surgical pathology* 22, 1435-1448.
31. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-E386.
32. Fortuny, J., Kogevinas, M., Zens, M. S., Schned, A., Andrew, A. S., Heaney, J., Kelsey, K. T., Karagas, M. R. (2007). Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study. *BMC Urol* 7, 1-9.
33. Gardenswartz, A., Aqeilan, R. I. (2014). WW domain-containing oxidoreductase's role in myriad cancers: Clinical significance and future implications. *Exp Biol Med* 239, 253-263.
34. Goldgar, D. E., Easton, D. F., Cannon-Albright, L. A., Skolnick, M. H. (1994). Systematic Population-Based Assessment of Cancer Risk in First-Degree Relatives of Cancer Proband. *J Natl Cancer Inst* 86, 1600-1608.

35. Golka, K., Selinski, S., Lehmann, M.-L., Blaszkewicz, M., Marchan, R., Ickstadt, K., Schwender, H., Bolt, H. M., Hengstler, J. G. (2011). Genetic variants in urinary bladder cancer: collective power of the “wimp SNPs”. *Arch Toxicol* 85, 539-554.
36. Gothlin Eremo, A., Wegman, P., Stal, O., Nordenskjöld, B., Fornander, T., Wingren, S. (2013). Wwox expression may predict benefit from adjuvant tamoxifen in randomized breast cancer patients. *Oncol Rep* 29, 1467-1474.
37. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883-899.
38. Groah, S. L., Weitzenkamp, D. A., Lammertse, D. P., Whiteneck, G. G., Lezotte, D. C., Hamman, R. F. (2002). Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: Evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Arch Phys Med Rehabil* 83, 346-351.
39. Guo, W., Dong, Z., Dong, Y., Guo, Y., Kuang, G., Yang, Z. (2013a). Genetic and epigenetic alterations of WWOX in the development of gastric cardia adenocarcinoma. *Environ Mol Mutagen* 54, 112-123.
40. Guo, W., Wang, G., Dong, Y., Guo, Y., Kuang, G., Dong, Z. (2013b). Decreased expression of WWOX in the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 52, 265-274.
41. Härkönen, P., Kyllönen, A. P., Nordling, S., Vihko, P. (2005). Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer. *The Prostate* 62, 267-274.
42. Helmrich, A., Ballarino, M., Tora, L. (2011). Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Mol Cell* 44, 966-977.

43. Hicks, R. M., Walters, C. L., Elsebai, I., Aasser, A. B., Merzabani, M. E., Gough, T. A. (1977). Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med* 70, 413-417.
44. Ho, C.-H., Sung, K.-C., Lim, S.-W., Liao, C.-H., Liang, F.-W., Wang, J.-J., Wu, C.-C. (2015). Chronic Indwelling Urinary Catheter Increase the Risk of Bladder Cancer, Even in Patients Without Spinal Cord Injury. *Medicine* 94, e1736.
45. Hoffmann, D., Masuda, Y., Wynder, E. L. (1969). Alpha-Naphthylamine and Beta-Naphthylamine in Cigarette Smoke. *Nature* 221, 254-&.
46. Huebner, K., Croce, C. M. (2001). FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. *Nat Rev Cancer* 1, 214-221.
47. Iliopoulos, D., Guler, G., Han, S.-Y., Johnston, D., Druck, T., McCorkell, K. A., Palazzo, J., McCue, P. A., Baffa, R., Huebner, K. (2005). Fragile genes as biomarkers: epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 24, 1625-1633.
48. Kantor, A. F., Hartge, P., Hoover, R. N., Fraumeni, J. F. (1988). Epidemiological Characteristics of Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Bladder. *Cancer Res* 48, 3853-3855.
49. Kausch, I., Jocham, D. (2007). Maligne Tumoren der Harnblase Praxis der Urologie. 3 ed., Vol. 2. Stuttgart: Thieme.
50. Khan, M. H., Khalil, A., Rashid, H. (2015). Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics Research* 97, e7 (1 pages).



51. Kluth, M., Runte, F., Barow, P., Omari, J., Abdelaziz, Z. M., Paustian, L., Steurer, S., Christina Tsourlakis, M., Fisch, M., Graefen, M., Tennstedt, P., Huland, H., Michl, U., Minner, S., Sauter, G., Simon, R., Adam, M., Schlomm, T. (2015). Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer* 137, 2354-2363.
52. Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68, 820-823.
53. Kumar, V., Robbins, S. L., Cotran, R. S. (2010): Robbins and Cotran pathologic basis of disease (8). Philadelphia: Saunders Elsevier.
54. Kuroki, T., Trapasso, F., Shiraishi, T., Alder, H., Mimori, K., Mori, M., Croce, C. M. (2002). Genetic Alterations of the Tumor Suppressor Gene WWOX in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 62, 2258-2260.
55. Lang, G. (2013): Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik (2). Wien: Springer.
56. Leissner, J., Ghoneim, M. A., Abol-Enein, H., Thüroff, J. W., Franzaring, L., Fisch, M., Schulze, H., Managadze, G., Allhoff, E. P., El-Baz, M. A., Kastendieck, H., Buhtz, P., Kropf, S., Hohenfellner, R., Wolf, H. K. (2004). Extended Radical Lymphadenectomy in Patients With Urothelial Bladder Cancer:: Results of a Prospective Multicenter Study. *The Journal of Urology* 171, 139-144.
57. Lewandowska, U., Zelazowski, M., Seta, K., Byczewska, M., Pluciennik, E., Bednarek, A. K. (2009). WWOX, the tumour suppressor gene affected in multiple cancers. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 1, 47-56.
58. Matanoski, G. (1981). Bladder Cancer Epidemiology. *Epidemiol Rev* 3, 203-229.
59. Mostafa, M. H., Helmi, S., Badawi, A. F., Tricker, A. R., Spiegelhalder, B., Preussmann, R. (1994). Nitrate, nitrite and volatile N-nitroso compounds in the urine of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* infected patients. *Carcinogenesis* 15, 619-625.

60. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
61. Nakazawa, K., Murata, S.-i., Yuminamochi, T., Ishii, Y., Ohno, S., Nakazawa, T., Kondo, T., Katoh, R. (2009). p16INK4a Expression Analysis as an Ancillary Tool for Cytologic Diagnosis of Urothelial Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 132, 776-784.
62. National Cancer Institute. Bethesda, M. (2015). SEER Cancer Statistics Factsheets Bladder Cancer. Retrieved 25.01.2015, 2015, Online-Publikation; <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>.
63. Nunez, M. I., Ludes-Meyers, J., Aldaz, C. M. (2006). WWOX protein expression in normal human tissues. *J Mol Histol* 37, 115-125.
64. Olumi, A. F., Tsai, Y. C., Nichols, P. W., Skinner, D. G., Cain, D. R., Bender, L. I., Jones, P. A. (1990). Allelic Loss of Chromosome 17p Distinguishes High Grade from Low Grade Transitional Cell Carcinomas of the Bladder. *Cancer Res* 50, 7081-7083.
65. Paige, A. J., Taylor, K. J., Taylor, C., Hillier, S. G., Farrington, S., Scott, D., Porteous, D. J., Smyth, J. F., Gabra, H., Watson, J. E. (2001). WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.
66. Pitard, A., Brennan, P., Clavel, J., Greiser, E., Lopez-Abente, G., Chang-Claude, J., Wahrendorf, J., Serra, C., Kogevinas, M., Boffetta, P. (2001). Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. *Cancer Causes Control* 12, 551-556.
67. Pluciennik, E., Nowakowska, M., Stepień, A., Wolkowicz, M., Stawinski, A., Rozanski, W., Lipinski, M., Bednarek, A. (2014). Alternating expression levels of WWOX tumor suppressor and cancer-related genes in patients with bladder cancer. *Oncol Lett* 8, 2291-2297.

68. Qin, H. R., Iliopoulos, D., Semba, S., Fabbri, M., Druck, T., Volinia, S., Croce, C. M., Morrison, C. D., Klein, R. D., Huebner, K. (2006). A Role for the WWOX Gene in Prostate Cancer. *Cancer Res* 66, 6477-6481.
69. Ramos, D., Abba, M., López-Guerrero, J. A., Rubio, J., Solsona, E., Almenar, S., Llombart-Bosch, A., Aldaz, C. M. (2008). Low levels of WWOX protein immunoexpression correlate with tumour grade and a less favourable outcome in patients with urinary bladder tumours. *Histopathology* 52, 831-839.
70. Richter, G. (2003): *Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken*. Stuttgart: Thieme.
71. Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J. K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D., Baker, E., Richards, R. I. (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* 9, 1651-1663.
72. Riede, U.-N., Walch, A., Wiestler, O. D. (2004). Störungen des Zellwachstums. In: U.-N. Riede (Ed.): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Vol. 5. Stuttgart: Thieme.
73. Ries, L., Eisner, M., Kosary, C., Hankey, B., Miller, B., Clegg, L., Edwards, B. (2000). SEER Cancer Statistics Review, 1973-1997. National Cancer Institute. Bethesda, MD, 444-457.
74. Rübben, H. (2014): *Uroonkologie (6)*. Heidelberg: Springer.
75. Sánchez-Carbayo, M. (2012). Hypermethylation in bladder cancer: biological pathways and translational applications. *Tumor Biology* 33, 347-361.
76. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467.
77. Schaaf, C. P., Zschocke, J. (2013): *Basiswissen Humangenetik (2)*. Berlin, Heidelberg: Springer.

- 
78. Schrock, M. S., Huebner, K. (2015). WWOX: A fragile tumor suppressor. *Exp Biol Med* 240, 296-304.
79. Schwender, H., Selinski, S., Blaszkewicz, M., Marchan, R., Ickstadt, K., Golka, K., Hengstler, J. G. (2012). Distinct SNP Combinations Confer Susceptibility to Urinary Bladder Cancer in Smokers and Non-Smokers. *PLoS One* 7, e51880.
80. Serizawa, R. R., Ralfkiaer, U., Steven, K., Lam, G. W., Schmiedel, S., Schüz, J., Hansen, A. B., Horn, T., Guldberg, P. (2011). Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer* 129, 78-87.
81. Spruck, C. H., Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., Lerner, S. P., Schmütte, C., Yang, A. S., Cote, R., Dubeau, L., Nichols, P. W., Hermann, G. G., Steven, K., Horn, T., Skinner, D. G., Jones, P. A. (1994). Two Molecular Pathways to Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Res* 54, 784-788.
82. Stein, C. K., Glover, T. W., Palmer, J. L., Glisson, B. S. (2002). Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chromosomes Cancer* 34, 333-340.
83. Strachan, T., Read, A. P. (2005): *Molekulare Humangenetik* (3). München: Spektrum.
84. Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719-724.
85. Taylor, D. C., Bhagavan, B. S., Larsen, M. P., Cox, J. A., Epstein, J. I. (1996). Papillary urothelial hyperplasia. A precursor to papillary neoplasms. *Am J Surg Pathol* 20, 1481-1488.
86. Vineis, P., Pirastu, R. (1997). Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 8, 346-355.
87. Wagener, C., Müller, O. (2010): *Molekulare Onkologie* (3). Stuttgart: Thieme.

- 
88. Wallmeroth, A., Wagner, U., Moch, H., Gasser, T. C., Sauter, G., Mihatsch, M. J. (1999). Patterns of Metastasis in Muscle-Invasive Bladder Cancer (pT2–4): An Autopsy Study on 367 Patients. *Urol Int* 62, 69-75.
89. Walsh, P. S., Erlich, H. A., Higuchi, R. (1992). Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *Genome Res* 1, 241-250.
90. Wang, M., Gu, J., Wang, Y., Gong, B. (2008). Loss of WWOX expression in human extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 39-44.
91. Watanabe, A., Hippo, Y., Taniguchi, H., Iwanari, H., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kodama, T., Aburatani, H. (2003). An Opposing View on WWOX Protein Function as a Tumor Suppressor. *Cancer Res* 63, 8629-8633.
92. Weinberg, R. A. (2014): The biology of cancer (2). New York: Garland Science.
93. Werner, M., Wilkens, L., Aubele, M., Nolte, M., Zitzelsberger, H., Komminoth, P. (1997). Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* 108, 381-390.
94. Williamson, M. P., Elder, P. A., Shaw, M. E., Devlin, J., Knowles, M. A. (1995). P16 (Cdkn2) Is a Major Deletion Target at 9p21 in Bladder-Cancer. *Hum Mol Genet* 4, 1569-1577.
95. Wittekind, C., Cancer, I. U. a. (2010): TNM-Klassifikation maligner Tumoren (7). Weinheim: Wiley-Blackwell.
96. Yang, W., Cui, S., Ma, J., Lu, Q., Kong, C., Liu, T., Sun, Z. (2012). Cigarette smoking extract causes hypermethylation and inactivation of WWOX gene in T-24 human bladder cancer cells. *Neoplasma* 59, 216-223.
97. Zhang, Jiang, Z., Ren, W., Yuan, L., Zhu, Y. (2016). Association of polymorphisms in WWOX gene with risk and outcome of osteosarcoma in a sample of the young Chinese population. *Onco Targets Ther* 9, 807-813.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abs	Absolut
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cap	Reaktionsgefäß
cFS	common Fragile site
CNV	Copy Number Variation
DAB	Diaminobenzidin
(d)dATP	(Di-)Desoxyadenosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECC	Extrahepatisches Cholangiokarzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Exon	kodierender DNA-Anteil
<i>FHIT</i>	Fragile Histidine Triad Gen
FHIT	Fragile Histidine Triad Protein
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
<i>FOR</i>	fragile site <i>FRA16D</i> Oxidoreductase Gen
FOR	fragile site <i>FRA16D</i> Oxidoreductase Protein
FRA16D	fragile site 16D
G	Grad
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
H/h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HIER	Heat Induced Epitop Retrieval
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
Intron	nicht kodierender DNA-Anteil
kV	Kilovolt
LOH	Loss of Heterozygosity
M	Metastase
mA	Milliampere
Mastermix	PCR-Ansatz ohne DNA
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

Min/min	Minute
mind.	mindestens
mM	Millimol
Na	Natrium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
<i>P16</i>	Tumorsuppressorgen 16
<i>p53</i>	Tumorsuppressorgen 53
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
POP	Performance Optimized Polymer
pRB	Retinoblastom-Protein
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
R	Rezidiv
Ras	rat sarcoma
RFU	relative fluid units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minuten
S/s	Sekunde
SDR	Short-chain-dehydrogenase
SH	Src-homology
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus
Spin Column	Zentrifugen-Filter-Säule
T	Tumor
Ta	Nichtinvasives Karzinom
Temed	Tetramethylethylendiamin
Tis/Cis	Carcinoma in situ
TMA	Tissue microarray
Tris	Tris-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Volt
Vortex	Reagenzglas mixer
W	Watt
WHO	World Health Organisation
WWOX	WW domain containing oxireductase Protein
<i>WWOX</i>	WW domain containing oxireductase Gen
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
°C	Grad Celsius

<b>7.2 Tabellenverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Tabelle 1: TNM Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (UICC 2009)	10
Tabelle 2: Konsens der World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) für die Klassifikation von urothelialen Läsionen (1998)	12
Tabelle 3: LOH-Multiplex-PCR Ansatz	26
Tabelle 4: LOH-Multiplex-PCR Thermocyclerprogramm	26
Tabelle 5: LOH-Multiplex-PCR Primer I und II	26
Tabelle 6: <i>WWOX</i> Singleplex-PCR Ansatz	27
Tabelle 7: Primersequenzen und PCR-Bedingungen	27
Tabelle 8: Thermocyclerprogramm A: FMO 55	27
Tabelle 9: Thermocyclerprogramm B: FMO 52	28
Tabelle 10: Thermocyclerprogramm C: Test 60	28
Tabelle 11: Sequenzierungs-PCR Ansatz	33
Tabelle 12: Sequenzierungs-PCR Thermocyclerprogramm	33
Tabelle 13: Grading, T-Stadium und Rezidive der untersuchten Urothelkarzinome	37
Tabelle 14: Verteilung des Immunscores auf T-Stadium und Grading und Rezidive	39
Tabelle 15: Korrelationen von Immunscore mit T-Stadium, Grading und Rezidiven	40
Tabelle 16: Übersicht der Karzinome mit LOH: Verteilung in Rezidiven, T-Stadien, Grading, und Immunscore	40
Tabelle 17 Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf die einzelnen Mikrosatellitenloci	42
Tabelle 18: Übersicht für T-Stadien, Grading, Immunscore und Rezidive der Karzinome in Bezug auf LOH in mindestens einem Locus	43
Tabelle 19: Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und T-Stadium, Grading, Rezidivierung oder Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus LOH	43
Tabelle 20: Statistische Auswertung des Vergleichs zwischen LOH-Analyse und Proteinexpression in Bezug auf LOH in mindestens einem Mikrosatellitenlocus in Intron 8	43
Tabelle 21 Genotypen- und Allelfrequenzen von Patienten (europäisch) und Europäern	46



---

Tabelle 22: Korrelationen der Genotypen- und Allelverteilung von rs3764340 für gesunde Europäer mit an Harnblasenkarzinomen erkrankten Europäern	46
Tabelle 23: Korrelationen der Genotypen- und Allelverteilung	47

<b>7.3 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1: Schema des <i>WWOX</i> Gens und Proteins: Das Gen (1,12 MB) besteht aus neun unterschiedlich großen Exons und acht Introns. Das Protein (414 Aminosäuren) enthält zwei WW-Domänen und eine Short-chain-dehydrogenase (SDR). Die Exons 1-4 kodieren für die WW-Domänen, die Exons 4-8 für die SDR. Verändert nach Chang et al. 2010.	18
Abbildung 2: Immunexpression des WWOX Proteins bei einem High grade Urothelkarzinom: Die Pfeile zeigen auf Regionen mit schwacher und moderater zytoplasmatischer sowie moderater nukleärer WWOX-Immunfärbung (630 fache Vergrößerung). Erstellt von PD Dr. Britta Kleist.	38
Abbildung 3: Immunexpression des WWOX Proteins bei low grade Urothelkarzinomen: Die Pfeile deuten auf Tumorzellen, die eine überwiegend schwache zytoplasmatische WWOX-Immunfärbung mit fokal starker perinukleär Akzentuierung zeigen. (400 fache Vergrößerung). Erstellt von PD Dr. Britta Kleist.	38
Abbildung 4: LOH in D16S3029 Proben-Nr. 11: Oben gesundes Gewebe mit zwei Peaks, was für Heterozygotie spricht. Unten Tumorgewebe mit einem gleich hohen Peak (links) und einem um mehr als 50% niedrigeren Peak (rechts, Pfeil), was LOH für diese Probe auf dem Mikrosatelliten D16S3029 beweist.	41
Abbildung 5: LOH in D16S504 Proben-Nr. 106: Oben gesundes Gewebe mit zwei Peaks, was für Heterozygotie spricht. Unten Tumorgewebe mit einem gleich hohen Peak (rechts) und einem um mehr als 50% niedrigeren Peak (links, Pfeil), was LOH für diese Probe auf dem Mikrosatelliten D16S504 beweist.	41
Abbildung 6: Variante in Exon 8 – oben Wildtyp (Proben-Nr. 27), Mitte heterozygot (Proben-Nr. 106), unten homozygot variantes Allel (Proben-Nr. 25); Sequenz: CTCTCTCCAACAAAAAC (C→G).	45

#### 7.4 Ergebnistabelle

A: Alter; m:männlich; w:weiblich; G:Grading, Th: Therapie; r.Z.: radikale Zystektomie; T-B: Transurethrale Blasenresektion; R: Rezidiv; n: nein; j:ja; IS: Immunscore; n.i.: nicht informativ; LOH: Loss of Heterozygosity

Nr.	A	m/ w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
1	58	m	pT3b pN0 pM0	G3	r.Z.	n	1	n	n.i.	LOH	LOH	GT	CC	GG	CC	CC
2	59	m	pT3b pN2 pM0	G3	r.Z.	n	n	n	LOH	n.i.	LOH	GG	CC	GA	CC	CC
3	79	m	pT3b pN1 pM0	G3	r.Z.	j	0	n	n	n	n.i.	GG	CC	GA	CC	CG
4	89	w	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	0	LOH	n	LOH	n.i.	GT	CC	GG	CC	CC
5	85	m	pT1a pN0 pM0	G3	T-B	j	j	n.i.	LOH	LOH	n	GT	CC	AA	CC	CC
6	61	m	pT3a pN0 pM0	G3	r.Z.	n	0	n	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
7	73	m	pT3b pN2 pM0	G3	r.Z.	j	0	n	n	n	n	GT	CC	GA	CC	CC
8	70	m	pT3b pN1 pM0	G3	r.Z.	j	0	n.i.	n	n	n.i.	TT	CC	AA	CC	CG
9	70	w	pT3b pN0 pM0	G3	r.Z.	n	n	n	LOH	LOH	n	GT	CC	AA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
			-Std.													
10	66	w	pTa pN0 pM0 pT1 pN0 pM0	G2	r.Z.	j	4	n	n	n	n	GG	CC	GG	CC	CG
11	85	m	pTa pN0 pM0	G3	T-B	n	2	LOH	LOH	n.i.	LOH	TT	CC	GG	CC	CC
12	54	m	pTa pN0 pM0 pT2a pN0 pM0	G2	T-B	n	2	n	n.i.	LOH	n.i.	GT	CC	AA	CC	CG
13	75	m	pTa pN0 pM0	G3	T-B	n	1	n	n	n	n	GG	CC	AA	CC	CC
14	86	m	pTa pN0 pM0 pT2a pN0 pM0	G2	T-B	j		n	n	n.i.	n	GT	CC	AA	CC	CC
15	72	m	pTa pN0 pM0	G1	T-B	n	1	n	n.i.	n.i.	n.i.	GT	CC	AA	CC	CC
16	86	m	pTa pN0 pM0 pT2a pN0 pM0	G3	T-B	n	2	n	LOH	LOH	n	GG	CC	GA	CC	CC
17	68	m	pTa pN0 pM0	G2	T-B	n	1	n	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
18	59	m	pTa pN0 pM0 pT2a pN0 pM0	G3	T-B	n		n	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
19	82	w	pTa pN0 pM0	G3	T-B	n	0	n	n	n	n.i.	GT	CC	AA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM _Std.	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
20	70	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n	2	n.i.	n	LOH	n.i.	GG	CC	AA	CC	CC
21	84	m	pT2a													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	4	n	n	n	n	GG	CC	AA	CC	CG
22	74	m	pT4a													
			pN2													
			pM0	G3	r.Z.	n	0	n.i.	LOH	LOH	LOH	GG	CC	GG	CC	CC
23	68	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	LOH	n.i.	LOH	GG	CC	AA	CC	CC
24	75	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	1	n	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CG
25	67	m	pT3													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	1	n	n	n	n	TT	CC	GA	CC	GG
26	78	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	n.i.	LOH	n.i.	LOH	GG	CC	AA	CC	CC
27	74	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n	n.i.	n	n	GG	CC	GA	CC	CC
28	75	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n.i.	n	n.i.	n	GG	CC	AA	CC	CC
29	80	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	4	n	n	LOH	n	TT	CC	AA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
-Std.																
30	75	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	2	n	n	n.i.	n	TT	CC	AA	CC	CC
31	70	m	pT2a													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	0	n	LOH	LOH	LOH	TT	CC	AA	CC	CG
32	61	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	4	n	n	n	n.i.	GG	CC	GA	CC	CC
33	88	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	n	LOH	LOH	LOH	GG	CC	GG	CC	CC
34	72	m	pT3b													
			pN0													
			pM0	G3	r.Z.	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	TT	CC	GG	CC	CC
35	67	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	2	n	n	n	n.i.	GG	CC	AA	CC	CC
36	72	w	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	TT	CC	GG	CC	CC
37	78	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	2	LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
38	88	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n	n	n.i.	n	GT	CC	GA	CC	CC
39	54	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	1	n.i.	n.i.	n	n	GT	CC	AA	CC	CG

Nr.	A	m/w	pTnM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340	
-Std.																	
40	54	w	pTa														
			pN0														
			pM0	G3	T-B	n	0	n	LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
41	53	w	pT1														
			pN0														
			pM0	G3	T-B	n	1	n	n	n.i.	n.i.	n.i.	GG	CC	GG	CC	CC
42	55	m	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	GA	CC	CC	CC
43	54	m	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	1	LOH	LOH	n.i.	n	GG	CC	GA	CC	CC	CC
44	58	m	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	2	n	n	n.i.	n	GG	CC	AA	CC	CC	CC
45	68	m	pT1														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	j	0	n.i.	LOH	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CC	CC
46	70	w	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	n.i.	n	n	GG	CC	GG	CC	CC	CC
47	70	m	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CC	CC
48	71	m	pTa														
			pN0														
			pM0	G2	T-B	n	2	n	n	n	n	GG	CC	GG	CC	CC	CC
49	72	w	pTa														
			pN0														
			pM0	G3	T-B	i	0	n	LOH	LOH	LOH	TT	CC	AA	CC	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM -Std.	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
50	80	m	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n		LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	GG	CC	CC
51	73	w	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	2	n.i.	n	n.i.	n	GG	CC	AA	CC	CC
52	72	m	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	0	LOH	n.i.	LOH	LOH	TT	CC	GG	CC	CC
53	80	m	pT2a pN0 pM0	G3	T-B	j		n	n.	n	n	GG	CC	AA	CC	CG
54	72	m	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	1	n	n	n	n	GG	CC	GA	CC	CC
55	72	m	pT1a pN0 pM0	G2	T-B	j	0	n	n.i.	n.i.	n.i.	TT	CC	GG	CC	CC
56	70	m	pT1a pN0 pM0	G2	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	n	GT	CC	GA	CC	CC
57	78	m	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	4	n	n	n.i.	n	TT	CC	AA	CC	CG
58	80	w	pT3b pN0 pM0	G3	T-B /r.Z.	n	0	n.i.	LOH	LOH	n	GT	CC	AA	CC	CC
59	73	m	pT2 pN0 pM0	G3	T-B	n	0	LOH	LOH	n.i.	LOH	GG	CC	AA	CC	CC



Nr.	A	m/w	pTNI	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
-Std.																
60	57	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	3	n	n.i.	n	n.i.	GG	CC	AA	CC	CC
61	75	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	1	LOH	n	n	n	GG	CC	GA	CC	CG
62	85	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	GG	CC	CG
63	85	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n	1	n	n	LOH	LOH	GG	CC	GG	CC	CC
64	67	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	2	n	n	n	n	GG	CC	AA	CC	CC
65	71	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n	1	n	n	n	n.i.	GG	CC	GG	CC	CC
66	63	m	pT2a													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	1	LOH	n.i.	n	n.i.	GG	CC	GG	CC	CG
67	74	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	j	0	LOH	LOH	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CC
68	68	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	1	LOH	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CG
69	74	w	pT2													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		LOH	LOH	LOH	n.i.	TT	CC	AA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
-Std.																
70	80	m	pT2a													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	1	n	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
71	79	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	1	n.i.	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
72	76	m	pT2a													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	LOH	n.i.	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
73	69	m	pT1a													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	j		n	LOH	n	n	GT	CC	GG	CC	CC
74	83	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	j	0	LOH	n.i.	LOH	n.i.	TT	CC	AA	CC	CC
75	63	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	n	n	n	n	GT	CC	AA	GC	CC
76	62	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CC
77	68	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	n.i.	LOH	LOH	LOH	GG	CC	GG	CC	CC
78	73	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n		LOH	LOH	n	n	GG	CC	AA	CC	CG
79	70	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n	n	n	n	GT	CC	GA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
			-Std.													
80	76	w	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n		n	LOH	LOH	n	GT	CT	AA	CC	CC
			pTa pN0 pM0	G2	T-B	n		n	n.i.	n	n	GG	CC	AA	CC	CC
81	70	w	pT1 pN0 pM0	G2	T-B	n		n	n.i.	n	n	GG	CC	AA	CC	CC
82	46	m	pT1 pN0 pM0	G2	r.Z.	n		n	n	n.i.	n	GT	CC	AA	CC	CC
83	59	w	pT1 pN0 pM0	G2	T-B	n	1	LOH	LOH	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
84	62	m	pTa pN0 pM0	G3	T-B	n	1	n	n	n.i.	n	GT	CC	GA	CC	CC
85	71	m	pTa pN0 pM0	G1	T-B	n		n	n	n.i.	n	GG	CC	GG	CC	CG
86	76	m	pT2 pN0 pM0	G3	T-B	j	0	LOH	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	GG	CC	GG
87	71	m	pT2b pN0 pM0	G3	T-B	n		n	n.i.	LOH	n	GT	CC	GG	CC	CC
88	71	w	pT2a pN0 pM0	G3	T-B	j	0	LOH	LOH	LOH	n.i.	GT	CC	AA	CC	CG
89	95	w	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	0	n.i.	n.i.	LOH	LOH	GG	CC	AA	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
			-Std.													
90	63	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	n	LOH	n.i.	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
91	76	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n		n		n	n	GG	CC	AA	CC	CC
92	71	w	pTa													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	LOH	n	n.i.	LOH	TT	CC	AA	CC	GG
93	74	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		LOH	LOH	LOH	LOH	GG	CC	GA	CC	CC
94	79	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	1	n.i.	n	n	LOH	GG	CC	AA	CC	CC
95	76	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n		n	n	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
96	77	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n.i.	LOH	n.i.	LOH	GT	CC	GA	CC	CG
97	83	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	j		LOH	n.i.	n.i.	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
98	79	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	n.i.	LOH	n.i.	TT	CC	AA	CC	CC
99	54	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n	n	n	n	GG	CC	GG	CC	CC

Nr.	A	m/w	pTNM	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
-Std.																
100	74	w	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
101	67	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		n	n.i.	LOH	n.i.	TT	CC	AA	CC	CG
102	56	m	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n		LOH	LOH	n.i.	LOH	GT	CC	GA	CC	CC
103	56	m	pT3a													
			pN0													
			pM0	G3	r.Z.	n	0	LOH	n.i.	n.i.	n.i.	GT	CC	AA	CC	CC
104	67	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	j	1	n	n.i.	n	n	GT	CC	AA	CC	CC
105	70	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G2	T-B	n		LOH	n.i.	n	n	GG	CC	GG	CC	CG
106	80	m	pT3b													
			pN0													
			pM0	G3	r.Z.	n		LOH	LOH	LOH	n.i.	GG	CC	AA	CC	CG
107	64	m	pT1													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	2	n	n.i.	n	n	TT	CC	GA	CC	CC
108	74	m	pTa													
			pN0													
			pM0	G1	T-B	n		n	n	n	n	GG	CT	AA	CC	CC
109	52	w	pT2													
			pN0													
			pM0	G3	T-B	n	0	n.i.	LOH	LOH	LOH	GT	CC	GG	CC	CC

Nr.	A	m	pTm	G	Th	R	IS	D16S3096	D16S3029	D16S504	D16S518	rs67493355	rs144601717	rs11545029	rs7201683	rs3764340
			/w	-Std.												
110	51	m	pT1 pN0 pM0	G3	T-B	n	0	LOH	LOH	n.i.	n.i.	GG	CC	GG	CC	CC
			pTa pN0													
111	70	w	pM0	G2	T-B	n	0	LOH	LOH	LOH	LOH	GT	CC	AA	CC	CC
			pTa pN0													
112	86	w	pM0	G3	T-B	n	1	n	n.i.	n	LOH	GT	CC	GA	CC	CC
			pT3 pN0													
113	82	m	pM0	G3	T-B	n	1	n	n.i.	n	n	GG	CC	AA	GC	CC
			pTa pN0													
114	67	m	pM0	G2	T-B	j	0	LOH	n.i.	n.i.	LOH	GG	CC	GG	CC	GG

## 8 DANKSAGUNG

*Iucundi acti labores - Angenehm sind getane Arbeiten (Cicero, de finibus 2,105).*

Beim Anfertigen dieser Dissertation standen mir einige Menschen mit Rat und Tat zur Seite, andere legten den Grundstein und stellten die Rahmenbedingungen für diese wissenschaftliche Arbeit. An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich bei all diesen Menschen zu bedanken, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Bajanowski für die gute Infrastruktur seines Instituts und der Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Micaela Poetsch, die mir jederzeit mit dem nötigen wissenschaftlichen Wissen, Tipps und Tricks sowie ihrer Erfahrung beiseite stand. Weiterhin danke ich für ihre Geduld mit mir und meiner Arbeit und für ihre Zeit, die sie für Korrekturen und allerlei Fragen opferte.

Herrn PD Dr. med. Chris Protzel aus der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Rostock und Herrn Dr. med. Christoph Kakies vom Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Rostock, welche die Basis für diese Dissertation legte durch die Beschaffung sowie Bereitstellung der Gewebeproben und deren pathologischer Beurteilung.

Frau PD Dr. rer. nat. Britta Kleist und Frau Bioing Christiane Lolandam vom Department of Pathology, Soerlandetsykehus HF in Kristiansand, Norwegen für die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen der Gewebeproben einschließlich deren Auswertung und die Bereitstellung der verwendeten Abbildungen.

Frau Birgit Perrey und Frau Heike Schäfer, welche mich tatkräftig bei den experimentellen Arbeiten im Labor unterstützten.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir bestmöglich mit Rat und Tat zur Seite standen und mich immer wieder motivierten. Mein besonderer Dank gebührt Frau Simone Tempel für ihre große Hilfe bei der Formatierung und Frau Angela Gores für die tatkräftige Hilfe bei der Erstellung meiner Abbildung. Und nicht zuletzt meiner Schwester, Herrn Dr. med. Volker Eimermacher und Frau Johanna Gores, die bei den letzten Korrekturen einen großen Beitrag leisteten.

## 9 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.